

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern

der Ludwig- Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Karl-Walter Jauch

**Untersuchung zur Bedeutung von Hyaluronsäure und ihrem
Rezeptor CD 44 für das Infiltrations- und
Metastasierungsverhalten von Magen- und
Pankreaskarzinomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Neumayr

aus München

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl-Walter Jauch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. A. Nerlich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ludger Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2007

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
 A. Einleitung	 1
I. Funktion von HA	1
II. HA-Rezeptoren.....	4
III. CD44	4
IV. HA-Rezeptor-Interaktion	7
V. Hyaluronidasen	8
VI. Tumorentwicklung.....	11
VII. Metastasierung.....	15
 B. Methodik	 25
I. Bestimmung des Hyaluronatgehaltes im Serum mit einem ELISA-ähnlichen Assay.....	25
II. Molekülgrößendifferenzierung mittels Gelfiltration und ELISA-ähnlichem Assay.....	27
III. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat	28
IV. Immunhistochemische Färbung von CD 44	29
V. Mikroskopische Beurteilung und fotografische Dokumentation.....	31
 C. Ergebnisse	 32

IV

I. Hyaluronatkonzentration im Serum.....	32
II. Relative Molekülgrößendifferenzierung von Hyaluronat	33
III. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat und CD 44 an Präparaten von Magenkarzinomen.....	35
IV. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat und CD 44 an Präparaten von Pankreaskarzinomen	40
 D. Diskussion	 44
I. Hyaluronatkonzentration und -Verteilung im Serum	44
II. Verteilungsmuster von HA und HA-Fragmenten im Serum.....	47
III. Inhibierung der Hyaluronidasen.....	50
IV. Histochemische Untersuchungen von HA und CD44 in Tumoren bei Pank- reaskarzinomen und Magenkarzinomen	54
V. Spaltung von CD44 und CD44-Verteilung in Tumorzellen	55
VI. Ansätze zur Tumorthherapie.....	56
VII. Neue Ansätze der Tumorthherapie	59
VIII. Hemmung von CD44	62
 E. Zusammenfassung	 65
 F. Literaturverzeichnis	 68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzentration von Hyaluronat im Serum in den drei Untersuchungsgruppen: Die Werte der Malignompatienten sind tendenziell höher als in der Kontrollgruppe, die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.	32
Abbildung 2: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Gesunden. Die Molekülgrößen nehmen im zeitlichen Verlauf in konstanten Schritten ab.	33
Abbildung 3: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Patienten mit Magenkarzinom.	34
Abbildung 4: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Patienten mit Pankreaskarzinom.	34
Abbildung 5: HA-Färbung, Magenkarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:40, 3-11	37
Abbildung 6: CD 44-Färbung, Magenkarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:100, 5-28	38
Abbildung 7: HA-Färbung, Magenkarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößerung 1:200, 5-6	39
Abbildung 8: CD 44-Färbung, Magenkarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößerung 1:100, 5-16	39
Abbildung 9: HA-Färbung, Pankreaskarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:40, 5-23	41

Abbildung 10: CD 44-Färbung, Pankreaskarzinom, Tumorzentrum, Vergrößerung 1:100, 3-16	42
Abbildung 11: HA-Färbung Pankreaskarzinom, Infiltrationsrand einer Leber- metastase, Vergrößerung 1:40, 5-21	42
Abbildung 12: CD 44-Färbung, Pankreaskarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößer- ung 1:100, 3-23	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Auswertung der untersuchten Präparate von Magen- karzinomen	36
Tabelle 2: Ergebnisse der Auswertung der untersuchten Präparate von Pankreas- karzinomen	40

A. Einleitung

Hyaluronsäure (HA) ist ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM), der nahezu ubiquitär in so gut wie allen Gewebearten des menschlichen Körpers vorkommt und von Fibroblasten produziert wird. Sie hat eine Schlüsselrolle in zahlreichen physiologischen Prozessen.

HA ist ein großes lineares Glykosaminoglykan, zusammengesetzt aus sich wiederholenden Einheiten von Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin, die alle über β —Bindungen, GlcA β -(1 \rightarrow)GlcNAc β (1 \rightarrow 4) verbunden sind. In „normalem“ Gewebe treten 2000-250000 Disaccharideinheiten auf, die zusammen eine Molekülgröße von $10^5 - 5 \times 10^7$ Dalton aufweisen. Auf Grund ihrer hohen anionischen Ladung kann sie sehr viele Wassermoleküle binden und so durch „Quellung“ einen wesentlich größeren Raum einnehmen, als es ihrer reinen Molekülgröße entspräche (Laurent *et al.* 1992). HA unterscheidet sich in einem Punkt von den anderen in der Extrazellulärmatrix vorkommenden Glykosaminoglykanen (Keratansulfat, Dermatan-sulfat, Chondroitinsulfat und Heparansulfat): HA besitzt keine Sulfatgruppen (Fraser, 1997). Die Synthese von HA findet an der Plasmamembran statt, während die anderen Glykosaminoglykane im endoplasmatischen Reticulum synthetisiert werden. An der Innenseite der Plasmamembran sind HA-Synthasen lokalisiert, die Mono- und Disaccharideinheiten an das Molekül addieren. HA wird als ein unmodifiziertes Polysaccharid von einer von drei HA-Synthasen HAS1, HAS2 oder HAS3 gebildet. Dabei wird das wachsende Molekül durch die Membran nach außen geschleust (Prehm, 1989; Asplund *et al.*, 1998; Weigel *et al.*, 1997).

I. Funktion von HA

HA hat verschiedene Funktionen. Aufgrund ihrer Viskosität und ihrer Fähigkeit, Wasser zu speichern, spielt sie eine wichtige Rolle bei der Homöostase und der biomechanischen Integrität. Außerdem ist sie an der Interaktion von Proteoglykanen und anderen extrazellulären Makromolekülen beteiligt. Sie spielt eine Rolle bei der Tumorprogression, Angiogenese und Metastasierung (zusammengefasst von Toole, 2004).

Bei der Wundheilung bildet HA z.B. die strukturelle Basiseinheit von Knorpelgewebe oder der Gleitsubstanz in der Synovialflüssigkeit (Ghosh 1994). Ferner erfüllt sie aber auch viele andere Funktionen wie z.B. die Förderung der Zellproliferation und Zellmigration während der Embryogenese und auch im Erwachsenenalter (Sherman *et al.* 1994).

HA ist eine wichtige Komponente der Wundheilung, bei der die Konzentration an HA in der Extrazellulärmatrix (ECM) mit der Menge an eingelagertem Kollagen und der Qualität der Wundheilung direkt korreliert. Obwohl die genaue Rolle der HA im Mechanismus der Wundheilung noch nicht geklärt ist, wurde mehrfach *in vitro* nachgewiesen, dass HA an verschiedensten Zelltypen wie z.B. Chondrozyten (Knudson *et al.* 1985), mesodermalen (Toole *et al.* 1991), mesothelialen (Heldin *et al.* 1993), synovialen (Clarris *et al.* 1968) und glatten Muskelzellen (McGuire *et al.* 1987) eine perizelluläre Matrix bildet. Es wird vermutet, dass diese perizelluläre Matrix die unmittelbare Umgebung stabilisiert und die Zelldifferenzierung beeinflusst (Knudson *et al.* 1985). Außerdem fördert sie die Zellmotilität (Hardwick *et al.* 1992) und -proliferation (Toole *et al.* 1993), beeinflusst die perizelluläre Umgebung, indem sie Wachstumsfaktoren bindet (Ruoslahti *et al.* 1992) und nimmt an der Chondrogenese teil (Bisle und Zychont, 1993).

HA bildet zusammen mit Fibronectin und Kollagen Typ III die primären Bestandteile der Extrazellulärmatrix, die durch Fibroblasten des frühen Granulationsgewebes im Verlauf der Wundheilung gebildet werden. Die Syntheserate von HA ist in verletztem Gewebe gegenüber gesundem, unverletztem Gewebe erhöht (Grinnell, 1984; Weitzhandler *et al.* 1992; Whitby *et al.* 1992). In diesem frühen Granulationsgewebe dominiert HA im Verlauf der Wundheilung und regt die Fibroblastenmigration durch ihre hohe Wasserbindungskapazität an, die für die Bildung großer Interzellularräume essentiell ist.

Die Synthese von Molekülen der Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten wird hierbei entscheidend durch Wachstumsfaktoren wie dem „Transforming-growth-factor- β -(TGF- β)“ und „Platelet-derived-growth-factor (PDGF)“ gesteuert. PDGF fördert die frühe Bildung von HA und die anschließende Synthese von sulfatierten Glykosaminoglykanen (Lawrence *et al.* 1994).

Erst in der letzten Phase der Wundheilung der Haut des Erwachsenen, in der das Granulationsgewebe in Narbengewebe umgewandelt wird, gehen die Konzentrationen von HA und sulfatierten Glykosaminoglykanen in den Normalbereich zurück (Miller und Gay, 1992; Mast 1992).

Dagegen werden z.B. in fetalen Wunden noch deutlich größere Mengen an HA und HA-Rezeptoren gebildet (DePalma *et al.* 1989; Longaker *et al.* 1989; Alaish *et al.* 1993). HA zeigt hier die Fähigkeit zur Hemmung fetaler Fibroblastenproliferation (Mast *et al.*, 1993). Umgekehrt hemmt die Behandlung fetaler Wunden auf Kaninchenhaut mit Hyaluronidase oder mit HA-Abbauprodukten, die *in vitro* durch Einwirkung von Hyaluronidase hergestellt wurden, die Wundheilung (Mast *et al.* 1991; Mast *et al.* 1995).

Eine sehr wichtige Rolle wird HA seit längerem auch in der Angiogenese zugeschrieben. Unter Angiogenese versteht man die Neubildung von Blutgefäßen. Hier konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass Oligosaccharide der HA mit vier bis sechzehn Saccharidgruppen *in vivo* die Angiogenese fördern und speziell die Endothelzellproliferation und sogar die Migration stimulieren.

Ferner konnte gezeigt werden, dass HA mit hohem Molekulargewicht direkt auf Endothelzellen einwirken kann und deren Proliferation hemmt. Zusammenhängende Zellschichten und Zellverbände können durch die hochmolekularen Anteile ihre Integrität verlieren und aufgelöst werden (West und Kumar, 1987; West und Kumar 1989; Folkman 1984; Folkman 1987).

Erhöhte Konzentrationen von HA werden in soliden Tumoren und den Fibroblasten des Tumorstromas produziert (Zhang *et al.*, 1995; Ropponen *et al.*, 1998).

Bei Gefäßkrankheiten wie Arteriosklerose werden vermehrt HA-bindende Proteine bei gleichzeitigem Anstieg der HA-Konzentration in den Entzündungsarealen der arteriosklerotischen, makrophagenreichen Läsionen und lipidreichen Plaques gebildet (Toole *et al.*, 2002; Evanko *et al.*, 1999).

II. HA-Rezeptoren

HA interagiert mit den Zellen auf wenigstens zwei verschiedenen Wegen. Sie kann an spezifische Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. CD44 und RHAMM (Receptor for hyaluronic acid mediated motility), LYVE1 (lymphatic-vessel endothelial hyaluronan receptor) und Toll4 binden und die Transduktion einer Reihe von intrazellulären Signalen auslösen, entweder direkt oder indem andere Rezeptoren aktiviert werden (Turley *et al.*, 2002). HA kann auch an der Zelloberfläche verbleiben und mit seinen Synthesen interagieren, wobei eine voluminöse perizelluläre Matrix entsteht, die verschiedene HA-Bindungsmoleküle inkorporiert (Toole, 2001 und 2004).

Bei der Tumorentwicklung spielen HA-bindende Rezeptoren eine wichtige Rolle (Yu und Stamenkovic, 1999). Durch HA wird das nicht-konfluente Wachstum gefördert (Kosaki *et al.* 1999). Das Zellwachstum kann unterbrochen werden, wenn Zellkulturen freies, nicht gebundenes CD-44 zugesetzt wird, das mit dem gebundenen CD-44 um die HA konkurriert (Peterson *et al.*, 2000).

HA ist aber auch in der Lage, zur Ablösung mehrerer Zelltypen zu führen und der Adhäsion entgegen zu wirken (Tucker und Erickson, 1984; Koochekpour *et al.*, 1995).

III. CD44

CD44 ist ein im menschlichen Körper weit verbreitetes transmembranes Glykoprotein der Zelloberflächen und der erste HA-Rezeptor, der gefunden wurde. Durch Bindung von HA an CD44 werden die Zellproliferation und die Motilität beeinflusst. CD44 vermittelt auch Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (Carter und Wayner, 1988; Aruffo *et al.*, 1990; Stamenkovic *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1992) sowie die interzelluläre Adhäsion (Shimizu *et al.* 1989; St.John *et al.*, 1990; Naujokas *et al.* 1993) und Lymphozytenaktivierung (Huet *et al.*, 1989; Haynes *et al.* 1989, Denning *et al.* 1990).

Das Zusammenspiel von CD44 mit HA ist sehr komplex, da CD44 neben HA auch an andere Komponenten und Zelloberflächenrezeptoren, Proteasen, Adhäsionsmoleküle (z. B. Catherine), Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), und Wachstumsfaktoren (z. B. Fibroblast growth factor), Osteopontin, Chondroitinsulfat (Aruffo *et al.*, 1990;

Stamenkovic et al., 1991) und Fibrin (Svee *et al.*, 1996) und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bindet. Verschiedene Adhäsionsproteine ergänzen sich funktionell und beeinflussen sich in einigen Fällen über intrazelluläre Regulationswege.

CD44 ist der erste Zelloberflächenrezeptor der HA, der identifiziert wurde (Underhill, 1992). Das Molekulargewicht beträgt 85900 -90000 Da. CD44 entsteht aus post-translationalen Modifikationen eines 37 kDa Ursprungmoleküls. CD44 wird durch Glykosylierung der N- und O-Verbindungen modifiziert. Weitere Modifikationen durch Anlagerungen von Chondroitinsulfat in die Isoformen ergeben ein Molekulargewicht von 180-200 kDa. CD44 ist ein saures Protein mit vielen Phosphoserin- oder Threoninresten und Disulfidbrücken. Der Rezeptor besitzt eine Transmembrandomäne mit 21 Aminosäuren, eine extrazelluläre Region mit 270 Aminosäuren und eine zytoplasmatische HA-bindende Region mit 72 Aminosäuren.

Die Aminosäuren Arg150 bis Arg 162 in der extrazellulären Region von CD44 scheinen besonders wichtig für die Bindung an HA zu sein, da Fusionsproteine, denen dieser Teil fehlt, eine deutlich geringere Affinität zu HA zeigen. Auch Punktmutationen in diesem Bereich gehen mit einer erniedrigten Bindungskapazität einher.

CD44 ist sowohl an der Aufnahme als auch am Abbau von HA beteiligt (Culty *et al.*, 1992). Makrophagen, die CD44 enthalten, können HA, das mit Fluorescein markiert ist, internalisieren. Dieser Prozess kann mit Antikörpern, die gegen den Rezeptor gerichtet sind, unterbrochen werden. Der Abbau von HA konnte durch Agenzien, die die Acidifizierung von Lysosomen blockieren (Chloroquin und NH_4Cl), unterbrochen werden. Es wurde festgestellt, dass der Rezeptor die Aufnahme von HA in die Zelle vermittelt, wo sie durch saure Hydrolasen in den Lysosomen abgebaut werden kann.

Verschiedene Splicing-Varianten der zehn extrazellulären Exons (V1-0) führen zu der Hauptform von CD44. Die Isoform von CD44, die in hämatopoetischen Zellen gefunden wird (CD44s), beinhaltet keine variablen exprimierten Exons, während die Isoform, die in Epithelzellen exprimiert wird (CD44(v8-10)) die Exons v8-10 beinhaltet. Die Isoformen, die für Metastasen spezifisch sind, wurden zuerst in einem Modell mit Ratten-Pankreas-Adenokarzinom-Zellen untersucht. Diese Formen sind CD44(v4-7) und CD44 (v6-7). In primären Tumorzellen und Metastasen von humanen Pankreas-

Adenokarzinomzellen kommen die Isoformen CD44(v6) oder CD44(v8-10) vor. Diese Isoformen unterscheiden sich nicht in metastatischen oder primären Pankreas-Adenokarzinomzellen. Eine CD44(V6)-Isoform wurde in metastatischen Läsionen gefunden (Rall und Rustigi, 1995).

Da in verschiedenen Zelltypen spezifische Isoformen von CD44 auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass das Splicing des Gens gezielt und reguliert stattfindet. Alternatives Splicing von CD44-mRNA führt nach Translation zu unterschiedlich großen CD44 Isoformen. Sie beeinflussen das Wachstum, indem sie Informationen über verschiedene Signaltransduktionswege leiten, die GTPasen und Proteinkinasen beinhalten.

Die Expression bestimmter CD-44-Varianten ist mit Metastasierung und Tumor-Wachstum verbunden. Die Formen mit hohem Molekulargewicht zeigen eine begrenzte Expression in Tumoren und könnten mit Tumorentwicklung und Metastasierung korrelieren. Harrison *et al.*, 2006, untersuchten in einer Studie mit Prostatakrebszelllinien die Expression der CD44-Varianten. Nicht-invasive Prostata-Epithelzellen exprimieren eine CD44-Isoform mit hohem Molekulargewicht, CD44v3-v10, die der Funktion der Standard-Isoform CD44 entgegenwirkt, indem die Adhäsion und Invasion des Epithels durch Prostata-Tumorzellen über eine Negierung der MMP-14-Funktion reduziert werden.

Yoshinari *et al.*, 1999, zeigten, dass die CD-44-Isoform v10 die Migration von Melanomzellen erhöht und dass HA die Tendenz zur Gewebeinvasion und die Gefährlichkeit verschiedener Zelllinien erhöhte.

CD44 spielt eine Rolle als Adhäsionsmolekül. Verschiedene CD44-Expressionsmoleküle unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur CD44-abhängigen Ligandenbindung. Deshalb liegt es nahe, dass die strukturellen Modifikationen von CD44 an der Heterogenität des Rezeptors beteiligt sind.

IV. HA-Rezeptor-Interaktion

Die Interaktion von HA mit CD44 und RHAMM führt zu zahlreichen zellulären Antworten, wobei Tyrosinkinasen, Proteinkinasen, die „focal adhesion kinase“ (FAK), P13K (Phosphatidylinositol-3-Kinase, die „mitogen-activated protein kinase“, der „nuclear factor kB“ und RAS wie auch Komponenten des Zytoskeletts involviert werden.

CD44 vermittelt mindestens drei wichtige physiologische Prozesse, wie die Signaltransduktion, das Zusammenfügen perizellulärer Matrices und die Rezeptor-vermittelte Internalisation (Knudson *et al.*, 2002). Die Beteiligung von CD44 am Abbau von HA wurde mittels CD44-null-Gewebe gezeigt, die nicht in der Lage waren, überschüssiges HA, z.B. in der Haut und in der Lunge zu zersetzen (Kaya *et al.*, 1997; Toole, 2001). Der Verlust der Fähigkeit HA abzubauen, führte in den CD44-null-Mäusen zum Tod der Tiere.

Endogenes polymeres HA interagiert mit zahlreichen CD44-Molekülen an der Zelloberfläche. Dies führt zur folgenden Organisation des Zytoskeletts über Interaktionen des zytoplasmatischen Endes des CD44-Moleküls mit den mit dem Zytoskelett assoziierten Komponenten wie Ezrin und Ankryrin (Knudson *et al.*, 2002). In Chondrozyten (Knudson *et al.*, 2002) und Keratinozyten (Tammi *et al.*, 2001) wurde gezeigt, dass der Eingriff in die Fähigkeit HA abzubauen direkt den HA- Katabolismus stört.

Der Gehalt von HA wurde in einer Reihe von Tumoren beschrieben. Wein *et al.*, 2005, untersuchten die Färbemuster von HA und ihren assoziierten Rezeptoren CD44 und HARE in Beziehung zum metastatischen Potential des mucoepidermalen Karzinoms (MC). Normales Salialis-Gewebe zeigte keine HA-Expression der Epithelzellen, während HA in Tumorzellen und in regionalen Lymphknoten, die Metastasen enthielten, gefunden wurde. Beide Gruppen waren signifikant. Tumore mit positiven Knoten zeigten die Tendenz zu mehr Zelloberflächen HA. Geringere Expression oder eine Down-Regulation von HARE wurde in den involvierten Lymphknoten gefunden. Es wurden keine Unterschiede in der CD44-Expression zwischen primären Proben und Lymphknoten gefunden.

HA erhöht die Aktivität von Proteintyrosinkinasen und fördert die Bildung von Zytokinen. Kamikura *et al.*, 2000, zeigten, dass HA-Zell-Wechselwirkungen die Zellbeweglichkeit, das invasive Verhalten und die maligne Transformation über die Interaktion mit dem Rezeptor CD-44 beeinflussen.

V. Hyaluronidasen

Hyaluronidasen spalten HA in kleinere Bestandteile auf. Auch sie kommen, genau wie die HA, in zahlreichen Organismen vor und haben dort verschiedene Funktionen: In pathogenen Mikroorganismen wie z. B. Clostridien oder Streptokokken sind sie Pathogenitätsfaktoren, d.h., durch die Spaltung von HA wird den Mikroorganismen das Eindringen in das Wirtsgewebe ermöglicht. Sie können sich dort miteinander verbinden und Kolonien bilden. Durch die Spaltung der HA in kleinere Bausteine wird der Zelltonus verändert und Abwehrmechanismen des Wirtes wie die Einwanderung phagozytischer Zellen in infiziertes Gewebe verhindert (Hynes und Walton, 2000).

Hyaluronidasen sind auch bei Insekten häufig vertreten. Hier fördern sie, besonders bei stechenden Insekten wie Bienen, Wespen und Hornissen die Gewebepenetration. Sie helfen, HA-haltige Gewebe zu zerstören und bewirken so die Gewebepenetration und eine bessere Resorption des Giftes. Die Geschwindigkeit der Giftwirkung wird deutlich erhöht (Frost *et al.*, 1996).

In Vertebraten haben Hyaluronidasen häufig mehrere Funktionen. Sie spielen zwar auch eine Rolle bei der Pathogenität (z. B. Tumormetastasierung), aber die Wirkung ist wesentlich komplexer als bei Insekten, da HA in Vertebraten nicht nur ein Bestandteil der Gefäße und der Haut ist, sondern auch Teil zahlreicher Regulationskaskaden auf zellulärer Ebene ist (Frost *et al.*, 1996).

Je nach Spaltungsmechanismus werden Hyaluronidasen in drei Untergruppen unterteilt. Die Hyaluronatglucanohydrolasen kommen in Vertebraten (Säugetern, Schlangen, Echsen) und Invertebraten wie Insekten, Spinnen und Skorpionen vor. Die HA wird an der β -1,4-glykosidischen Bindung am nicht-reduzierten Ende und bei N-Acetyl- β -D-

Glucosamin am reduzierten Molekülteil hydrolytisch gespalten. Dabei entstehen gesättigte Oligosaccharideinheiten mit D-Glukuronsäure.

β -1,3-Hyaluronatglucanohydrolasen kommen bei Invertebraten vor und spalten HA hydrolytisch an der D-Glukuronsäure in β -1,3-Stellung zu gesättigten Oligosacchariden mit N-Acetyl- β -D-Glukosamin am nicht reduzierten und D-Glukuronsäure am reduzierten Molekülende.

Die dritte Gruppe umfasst die Hyaluronatlyasen, die in Mikroorganismen vorkommen und HA an der β -1,4-glykosidischen Bindung am N-Acetyl- β -D-Glukosamin zu Oligo- und Disacchariden spalten (Kreil, 1995).

In einigen Tumor-Typen wurden erhöhte Mengen Hyaluronan gefunden (Delpech *et al.*, 1993). Dies führte zu der Annahme, dass HA die Tumordinvasion erleichtert, indem die Zellmigration gefördert wird und das Gewebe expandieren kann. Tumorzellen mit großen HA-Mengen sind stärker invasiv und metastatisch. Außerdem ist HA an der Angiogenese beteiligt (West und Kumar, 1989). HA mit großem Molekulargewicht verhindert das Kapillarwachstum, während kleiner HA-Fragmente (4-16 Disaccharide) die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* stimulieren (West und Kumar, 1989). Der Abbau von HA an bestimmten Stellen kann deshalb ein angiogenetischer Stimulus sein.

Fünf menschliche Hyaluronidasen sind bekannt. Ph-20 ist am Abbau der HA-reichen Kumulus-Schicht, die das Ei umgibt, durch Spermazellen beteiligt (Gmachl *et al.*, 1993). Hyal1 ist eine Serum Hyaluronidase, die am Abbau von HA, das im Blut zirkuliert beteiligt sein soll. Alle HA, außer Ph-20 haben ein saures pH-Optimum. Die Mehrheit der „small cell lung cancers (SCLC) besitzen eine homo- oder heterozygote Deletion der 3p21.3-Region auf dem Chromosom3. Dies führte zur Vermutung, dass auf diesem Gen ein Tumorsuppressor lokalisiert ist (Kok *et al.*, 1987). Später wurde gefunden, dass dieser Suppressor mit dem Gen der Hyaluronidase1 übereinstimmt. (Csoka *et al.*, 1998).

Das Hyaluronidase-Gen Hyal-2 kann wie ein Onkogen agieren. Die Überexpression kann die Tumorbildung beschleunigen (Novak *et al.*, 1999). Hyal-2 ist aber auch ein Zelloberflächenrezeptor, der das Envelope-Protein einiger Retroviren bindet, das die onkogene Transformation vermittelt (Rai *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2001). Aber Hyal-2 agiert unter bestimmten Bedingungen auch als Tumor-Suppressor-Gen (TSG)-Produkt.

Hyal-2 kann die Apoptose beschleunigen (Chang, 2002). Außerdem unterdrückt der Adenovirus-Hyal-2-Vektor das Wachstum eines Tumor-Xenotransplantat in Mäusen (Ji *et al.*, 2002).

Bei Brust-, Magen- und Darmtumoren wurde gefunden, dass sie von einer Bindegewebsmatrix umschlossen sind und dass Tumore mehr HA bilden als gesunde Zellen. Die Anwesenheit von HA fördert die Migration und das Wachstum von Fibrosarkomzellen in Soft-Agar. In Gegenwart von HA erhöht sich *in vitro* die Bildung von Zytokinen wie Interleukin- β (IL- β) und Tumornekrosefaktor $-\alpha$ (TNF). Diese Zytokine stimulieren wiederum die Bildung von HA. Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor erhöht die HA-Synthese durch Aktivierung der Keratinozyten-HA-Synthetase und die Expression des HA-Zellrezeptors CD44 (Karvinen *et al.*, 2003).

HA ist wahrscheinlich auch an der Informationsübertragung auf molekularer Ebene beteiligt. Zum einen führt der Abbau der HA-Matrix zur Freisetzung der oben genannten gebundenen Zytokine. Aber auch die Degradationsprodukte der HA dienen zur Informationsübertragung. In den unterschiedlichen Molmassen der Abbauprodukte können Informationen verschlüsselt sein. So zeigen Matrix-Degradationsfragmente mit Molmassen zwischen 60 und 600000 Dalton eine andere Wirkung als hochmolekulare HA-Fragmente mit Molmassen über 1 Mio. Da. Die Fragmente entstehen z.B. unter dem Einfluss von körpereigenen Hyaluronidasen, durch oxidative Prozesse, oder durch tierische und mikrobielle Hyaluronidasen und Hyaluronlyasen, die von außen zugeführt wurden. Es wurde auch gefunden, dass relativ kleine Degradationseinheiten (3-10 Disaccharideinheiten) der HA die Gefäßbildung fördern (Slevin *et al.*, 1998). Wahrscheinlich führt hier die Tyrosinphosphorylierung am CD44 zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Signalkaskade und so zur Zellteilung.

Die in der Matrix abgebauten Fragmente der HA sind in der Lage, dem Körper zu signalisieren, dass pathologische Prozesse stattfinden (Sun 2002). HA-Fragmente induzieren die Bildung der Cyclooxygenase-2 und sind an der Thromboxan-vermittelten Immunantwort beteiligt (Filion und Philipps, 2002). Sie weisen eine pro-inflammatorische Aktivität auf. Das Tetrasaccharid fördert die Bildung von Schock-Proteinen (Filion und Philipps, 2002; Liu, *et al.*, 1996).

Durch die Überexpression körpereigener Hyaluronidasen wird die Tumorentwicklung unterstützt, da die entstandenen HA-Fragmente die Angiogenese (West *et al.*, 1985) und die Blutversorgung des Tumors fördern (Liu *et al.*, 1996).

VI. Tumorentwicklung

Die Entwicklung eines Tumors ist ein mehrstufiger Prozess, der in vielen Einzelheiten noch ungeklärt ist, an dem aber verschiedene genetische, physiologische und zelluläre Komponenten beteiligt sind (Zetter, 1990). Zu diesen Komponenten gehören auch HA und Hyaluronidasen, die in paradoxer Weise beide gleichzeitig bei der Tumorentwicklung und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen.

Eine Voraussetzung dafür, dass sich vereinzelte Krebszellen zum Tumor entwickeln können, ist, dass die Tumorzellen mit ihrem erhöhten Stoffwechselbedarf ausreichend metabolisch versorgt werden. Dazu muss der sich entwickelnde Tumor die Bildung neuer Blutgefäße induzieren. Durch die neuen Blutgefäße ist die Versorgung des Tumors gewährleistet. Außerdem ist eine Metastasierung des Primärtumors möglich (Folkman, 1992). Wenn sich Metastasen bilden, müssen diese die interzelluläre Adhäsion überwinden, damit sie sich vom Primärtumor lösen können. So überwinden sie auch andere Gewebearrieren. Um dieses zu ermöglichen, muss die umgebende Extrazellulärmatrix ihre Struktur so verändern, dass die metastasierenden Tumorzellen in benachbarte Gewebe auswandern können. Gleichzeitig müssen gefäßbildende Epithelzellen angeregt werden, in das den Tumor umgebende Gewebe einzuwandern und dort die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren (Stedler-Stevenson *et al.*, 1993).

Der Primärtumor sezerniert Metalloproteasen und Hyaluronidasen in das ihn umgebende Gewebe. Die Metalloproteasen bauen Gewebestrukturproteine ab, während die Hyaluronidasen das Proteoglykangerüst des Gewebes lockern, indem sie die Polysaccharidkomponenten HA, Dermatan sulfat und Chondroitin sulfat spalten. Da HA eine der Hauptstrukturkomponenten des Gerüsts ist, die für die Erhaltung des Gewebeturgors wie auch für die osmotischen Verhältnisse im Gewebe verantwortlich ist, wird durch den Abbau von HA sowohl die Stabilität als auch die Funktionalität des Gewebes eingeschränkt (Liu *et al.*, 1996).

Da intakte HA eine Barriere für die Neovaskularisation darstellt, ist ihr Abbau eine Voraussetzung für die Gefäßneubildung im Tumor. Mit Hilfe der Hyaluronidasen schaffen die Tumorzellen die Voraussetzungen für die Neovaskularisation, indem sie die Barrieren abbauen und durch Gewebepenetration die Ausbreitung der von ihnen sezernierten angiogenen Faktoren wie VEGF oder FGF-2 fördern. Diese angiogenen Faktoren aktivieren vaskuläre Epithelzellen und locken sie chemotaktisch zum Tumor. Die gleichzeitige Schädigung des Gewebes erleichtert den aktivierten Endothelzellen den Gewebeeintritt. Durch oberflächenspezifische Adhäsionsmoleküle, die die Adhäsion, Differenzierung und das Überleben der aktivierten Epithelzellen steuern, wird die Gefäßneubildung induziert. Diese neu gebildeten Gefäße zum Tumorgewebe sind die Voraussetzung für die stabile metabolische Versorgung des Tumors und seine weitere Entwicklung.

Hyaluronidasen fördern auch die Angiogenese, indem sie durch Abbau der Hyaluronsäure HA-Fragmente freisetzen, die stark angiogene Eigenschaften aufweisen und wahrscheinlich nicht durch antiangiogene Gewebefaktoren blockiert werden können (Montesano *et al.*, 1996).

LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) ist Bindungspartner für ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), das auf Gefäßendothelzellen durch Zytokine (IL-1, TNF oder γ -Interferon) induziert werden kann. Bei Kolon-Karzinomzellen wurde gezeigt, dass die Stimulation dieser Zellen durch CD-44-Quervernetzung oder ein HA-Fragment (6900 Da) zur Expression von LFA-1 und dessen Aktivierung führt. Dies ermöglicht die Adhäsion von Tumorzellen an ICAM-1 tragende Endothelzellen, die Voraussetzung für eine transendotheliale Migration.

Simpson *et al.*, 2002, fanden, dass die Inhibierung der endogenen HA-Synthese zu einer dramatischen Reduktion des Tumorwachstums bei menschlichen Prostata Karzinomzellen (PC3M-LN-4) *in vivo* führt. Diese Zellen tragen zwei der drei Synthesen, die HA synthetisieren (HAS2 und HAS3). Transfektanten dieser Zelllinie mit antisense-HAS2 und HAS3mRNA synthetisierten signifikant weniger HA. Toole und Hascall, 2002, beschreiben die Wirkung von stabilen Transfektanten mit antisense-

HAS2 und -HAS3 allein oder in Kombination und das Tumorwachstum bei immungeschwächten Mäusen. Nach dreiwöchiger Inkubation produzierten die antisense-HAS-Transfektanten Tumore, die drei- bis vierfach kleiner waren als die Kontrollen. Trotz Inhibierung der HA-Synthese und der Zellproliferationsrate in der Kultur, zeigten sich bei antisense-HAS-transfektierten Tumoren ähnliche Verhältnisse wie bei den sich teilenden und apoptotischen Zellen und der Kontrolle. Die Dichte der Blutgefäße war um 70-80 % im Tumor reduziert. Dies bedeutet, dass die HA-Level eine wichtige Determinante der Vaskularität sind und dass diese eher als die Proliferation der wichtigste Faktor der Effekte von Hyaluronat beim Tumorwachstum in diesem Modell ist. Interessanterweise waren, wenn exogenes HA bei der Initial-Injektion der transfektierten Tumorzellen zugegeben wurde, die Level des Tumorwachstums und der Vaskularisierung mit denen der Kontrolle vergleichbar. Deshalb wird angenommen, dass die frühen angiogenen Ereignisse entscheidend sind (Toole und Hascall, 2002).

In Zellkulturen von Tumorzellen und Stromagewebezellen, Tiermodellen und bei Patienten mit Tumoren wurde eine Korrelation zwischen der Tumorprogression und der HA-Produktion festgestellt. Der HA-Gehalt korreliert mit einer verstärkten Progression bei Brust-, Eierstock, Prostata- und Kolorektalen Tumoren (Delpech *et al.*, 1997; Toole *et al.*, 2002).

Proteoglykane sind in der Lage, Wachstumsfaktoren zu binden (Ruoslahti und Yamagushi, 1991). Wird HA durch Hyaluronidasen abgebaut, werden große Mengen Wachstumsfaktoren freigesetzt, die das nicht regulierte Wachstum tumorspezifischer Zellen stimulieren und so zum Tumorwachstum beitragen.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Gabe von HA-Oligosachariden zur erhöhten Angiogeneserate, aber die Gabe von hochmolekularem HA zur Inhibierung der Angiogenese führt (West und Kumar, 1989; Rooney *et al.*, 1995). Toole und Hascall, 2002, fanden, dass die Inhibierung der HA-Synthese die Tumurvaskularisierung gegenüber den Kontrollen dramatisch reduziert und dass die Co-Injektion von exogenem, hoch-molekularem HA in die inokulierten Tumorzellen die Dichte der Blutgefäße wieder herstellt. Da die HA-Synthasen hoch-molekulares HA herstellen, scheint dies auf den ersten Blick widersprüchlich zu den anderen Befunden zu sein.

Aber es wurde auch gezeigt, dass neben HA selbst auch die Level der Hyaluronidasen und des Hyaluronatabbaus mit der Tumorprogression korrelieren und die Tumorangiogenese stimulieren. So lässt sich aus der Arbeit von Toole und Hascall, 2002, schließen, dass der durch Hyaluronat vermittelte Abbau des Tumor-Hyaluronats große Mengen an HA-Oligosacchariden bereitstellt, die die Tumorangiogenese stimulieren und infolgedessen das Tumorwachstum. Diese Hypothese wird von Versuchen mit Gliom-Zellen, die keine Hyaluronidase exprimieren können, gestützt. Sie sind auch nicht in der Lage, die Tumor-Progression zu stimulieren.

Die Fähigkeit von Tumoren einerseits zu wachsen und andererseits Metastasen zu bilden ist von der Angiogenese abhängig. Die Zielzellen der Tumor-Neovaskularisation sind die Endothelzellen der Blutgefäße. Es wird davon ausgegangen, dass spezifische angiogenetische Moleküle, die vom Tumor produziert oder induziert werden, für diesen Prozess verantwortlich sind. Eines der Moleküle, die für die Neoangiogenese verantwortlich sind, ist HA. Je nach Molekülgröße werden ihr verschiedene Rollen in diesem Prozess zugeschrieben: HA mit einem größeren Molekulargewicht wirkt anti-angiogenetisch, während Oligosaccharide von HA mit einer spezifischen Größe aktiv die Proliferation und die Migration von Endothelzellen stimulieren. Proliferation der Endothelzellen und deren Migration sind die zwei Schlüsselereignisse der Neovaskularisation und sie induzieren *in vivo* die Angiogenese (Rooney *et al.*, 1995).

Le Baron *et al.*, 1992, isolierten und klonierten Versican (ein großes Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan) aus menschlichen Fibroblasten. Der N-Terminus der Sequenz zeigte Sequenzhomologie mit bekannten HA-bindenden Molekülen. Sie postulierten, dass Versican HA binden kann und wiesen dies mittels Affinitätschromatographie nach.

Stern, 2004, beschreibt einen neuen Abbauweg von HA und die Wirkungsweise der abgebauten HA-Fragmente, an dem CD44, zwei Hyaluronidasen (Hyal-1 und Hyal-2), zwei lysosomale Enzyme, β -Glukuronidasen und β -N-Acetylglukosamidasen beteiligt sind. Der schrittweise Abbau von HA führt zu verschiedenen Oligomeren unterschiedlicher Größe und Funktionen. So sind die extrazellulären hoch-molekularen HA-Polymere raumfüllende Moleküle, die das Gewebe hydratisieren (Feinberg und

Beebe, 1983). Die großen HA-Moleküle im Knorpel, der Glaskörper im Auge und die Synovialflüssigkeit der Gelenke sind eine Erklärung dafür, dass Blutgefäße nicht in diese Strukturen einwandern können. Diese HA-Polymere wirken auch anti-entzündlich und immunsuppressiv (Delmage *et al.*, 1986; Mc Bride und Bard, 1979). Dies liegt zum Teil an der Fähigkeit der raumfüllenden Polymere, den Zugang der Liganden an ihre Rezeptoren auf den Zelloberflächen zu blockieren.

Die 20-kDa-Fragmente, Produkte der Hyal-2-Spaltung wirken hoch angiogen (West *et al.*, 1985) und stimulieren die Synthese inflammatorischer Zytokine (Noble, 2002). Diese HA-Fragmente induzieren die Transkription der Matrix-Metallproteasen (MMPs) (Fieber *et al.*, 2004). Sie stimulieren das Erkennen einer Verletzung durch das Endothel (Taylor *et al.*, 2004). Oligomere mit einer Größe von 6 bis 20 kDa induzieren in dendritischen Zellen die Expression von inflammatorischen Genen (Termeer *et al.*, 2000 und 2003). HA-Fragmente sind also hoch angiogen, inflammatorisch und immunstimulierend. Sehr kleine HA-Oligosaccharide haben auch spezifische Aktivitäten. Tetrasaccharide induzieren die Expression von Hitzeschockproteinen und sind anti-apoptotisch. Sie unterdrücken den Zelltod (Xu *et al.* 2003). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Fragmente von HA während des katabolischen Stoffwechselweges Produkte, die größenspezifisch sind, bilden, die sich stark in ihren biologischen Aktivitäten unterscheiden. Das Single-Zucker-Produkt, Glukuronsäure und ein Glukosaminderivat werden von Lysosomen ins Zytoplasma freigesetzt, wo sie für andere Stoffwechselzyklen zur Verfügung stehen.

Der HA-Abbau ist ein hoch geordneter und sorgfältig kontrollierter Prozess.

VII. Metastasierung

Um Metastasen zu bilden, müssen sich die Tumorzellen vom Zellverband lösen, indem sie die interzelluläre Adhäsion überwinden und bestehende Barrieren durchdringen, also durch die ECM migrieren, im Blut oder lymphatischen System zirkulieren, sich wieder anheften und schließlich wachsen (Liotta, 1987). Dazu muss die umgebende Extrazellulärmatrix so verändert werden, dass die Metastasen in benachbarte Gewebe auswandern und gleichzeitig gefäßbildende Epithelzellen zur Bildung neuer Blutgefäße

in das den Tumor umgebende Stroma einwandern können (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993). Die Metastasierung von Tumorzellen ist ein komplexer Prozess, der mehrere separate Schritte umfasst. Die metastatische Kaskade wird mittels Motility-Faktoren, die am Rezeptor binden und Signaltransduktion veranlassen, ausgelöst, und vermittelt schließlich die Mobilisierung der Tumorzellen. Der Abbau der ECM ist ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Zellinvasion (Jiang, *et al.*, 1994).

HA stimuliert die Migration einer großen Anzahl von Zelltypen, einschließlich Tumorzellen. Die erhöhte Produktion von HA in Tumorzellen oder tumorassoziierten Fibroblasten korreliert mit der Zellmigration und Metastasierung (Docherty *et al.*, 1989; Turley, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Ropponen *et al.*, 1998). Allerdings gibt es verschiedene Erklärungsansätze für den Wirkungsmechanismus. Toole *et al.*, 1982, nahmen an, dass HA durch seine Fähigkeit große Mengen Wasser zu binden, Wasserkanäle in der Extrazellulärmatrix bildet. Als HA-Oberflächenrezeptoren gefunden wurden, wurde gezeigt, dass HA spezifisch an Zelloberflächenrezeptoren bindet und durch deren Inhibition wiederum die Zellmigration und das Tumorstadium gehemmt werden (Sherman *et al.*, 1994).

Tumorstadium und Metastasierung sind abhängig von der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Gewebestroma des Wirtes. Diese Interaktion wird über verschiedene Adhäsionsrezeptoren in verschiedenen Tumorzelltypen vermittelt. Es gibt Hinweise, dass die Interaktion des HA-Rezeptors CD44, der von den Tumorzellen exprimiert wird, mit der HA des Wirt-Gewebe-Stromas das Wachstum und die Fähigkeit zur Invasion fördert. Wird die Interaktion von CD44 und HA mittels löslicher rekombinanter CD44 unterbrochen, wird auch die Tumorbildung in Lymphomen und Melanomzellen, die mit CD44 transfektiert waren, verhindert. Es wurde gezeigt, dass HA-Oligomere in Konzentrationen von 1 mg/ml, die subkutan verabreicht wurden, das Wachstum von Melanomzellen B16F10 unterdrückten. Deshalb stellen diese Oligomere ein attraktives Reagenz zur Kontrolle der lokalen Tumorentwicklung dar (Zeng *et al.*, 1998).

HA und CD44 spielen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung. Maus-Mammakarzinom-Zelllinien, die wenig HA produzieren, bilden weniger Metastasen als

starke HA-Produzenten. Eine Stimulierung der HA-Produktion durch transgene Expression von Has1 in den Zelllinien, die geringe HA-Level zeigten, produzierten eine größere Anzahl von Knoten. (Itano *et al.*, 1999). Die Transfektion von stark metastasierenden Zellen mit cDNA, die CD44 codiert (CD44 ist ein Antagonist der konstitutiven HA-Rezeptor-Interaktion) inhibierte die Bildung von Knoten in der Lunge (Yu *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Abwesenheit von CD44 die Metastasierung in Mäusen, die im Apc oder Trp53-Gen mutiert waren, supprimiert (Weber *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD44-Gen-Produkte nicht essentiell für die Tumorbildung sind, aber eine wichtige Rolle bei der Regulation der Metastasenbildung spielen.

Die Invasion und Metastasierung von Krebszellen und die Entwicklung von Resistenz gegen anti-Tumorthérapien sind die Hauptgründe für Morbidität und Mortalität bei Krebs. P-Glykoprotein und CD44 wurden charakterisiert und sind als Determinanten der „multidrug resistance“ (MDR) und Metastasierung bekannt. Bisher wurde wenig über eine direkte Verbindung dieser beiden Moleküle diskutiert. Gonzales *et al.*, 2005, zeigten eine physikalische und genetische Interaktion zwischen CD44 und dem P-Glykoprotein, die zum Teil für eine Korrelation zwischen MDR und dem invasiven Potential von Krebszellen verantwortlich ist. Substrate, die für das P-Glykoprotein spezifisch sind, reduzieren *in vitro* die Invasion, Migration und die physikalische Co-Lokalisation von CD44 und P-Glykoproteinen. Die CD44-Expression in sensitiven Zellen fördert die Expression des P-Glykoproteins und des MDR-Phänotyps. Eine Störung der RNA von MDR1 inhibierte die Rate der Zellmigration. Diese Daten zeigen, dass es eine enge Interaktion zwischen CD44 und dem P-Glykoprotein gibt, die zu einer gleichzeitigen Expression und Modulation der zwei malignen Phänotypen, Invasion und MDR führen.

CD44 hat verschiedene Funktionen bei Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen. Es kann ein Marker zur Bestimmung der Metastasierung und von invasivem Tumorverhalten sein. Gouissa und Agnantis, 1999, untersuchten immunhistochemisch die Korrelation der Expression von CD44 in 110 kolorektalen Karzinomen und 25 Adenomen mittels monoklonalem Mouse-anti-human-phagocytic

Glycoprotein-1, CD44 (Clon DF 1485) und u.a. der basement Membran-Antigene (Typ IV Collagen und Laminin) und Fibronectin. Die CD44-Expression in Karzinomen war höher als in Adenomen, aber nicht signifikant. Die CD44-Expression korrelierte mit der Tumorgroße, dem Tumorzellen-Cathepsin und dem RB-Protein.

Die metastatische Invasion ist der Hauptgrund der Mortalität bei Brustkrebs. Es wird vermutet, dass Adhäsionsrezeptoren wie CD44 eine wesentliche Rolle bei diesem Prozess spielen. Epithelgewebe von Brusttumoren wurde in bisherigen Studien isoliert und ohne Berücksichtigung der anderen Gewebekomponenten untersucht. Dies führte zu der allgemeinen Interpretation, dass CD44 und der Hauptligand HA die Invasion fördern. Lopez *et al.*, 2005, zeigten jedoch, dass sich CD44 zur Metastasierung bei Brustkrebs antagonistisch verhält. Im Mausmodell mit spontan metastasierenden Brustkrebs-Zellen (MMTV-PyVmT) wurde gezeigt, dass der Verlust von CD44 die Metastasierung in der Lunge fördert. Kombinierte Lokalisations-Versuche in Kombination mit einer neuen HA-Synthase-GFP-transgenen-Maus zeigten ein begrenztes Muster der CD44 und HA-Expression. Während CD44 im Epithelium des Tumors exprimiert wird, ist die Expression der HA-Synthase auf das dem Stroma-assoziierte Gewebe begrenzt. Die eindeutigen CD44- und HA-Muster der Verbreitung lassen auf eine Rolle der Epithel-Stroma-Interaktion bei der CD44-Funktion schließen. Während der Brustkrebs-Progression schützt die HA-CD44-Interaktion im Epithel-Stroma gegen Metastasierung.

E-Cadherin ist ein Glykoprotein, das in der Aufrechterhaltung der Integrität und Organisation von Gewebestrukturen eine Rolle spielt. Eine niedrige E-Cadherin Expression des Primärtumors korreliert mit einer steigenden Rate an Tumorrezidiven und verringert die Überlebenschance der Patienten. CD44-HA-Interaktionen steigern das Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung. Zahlreiche Neoplasien, epithelialen und mesenchymalen Ursprungs zeigen eine hohe Expression von CD44H (einer Standard-CD44-Isoform), sowie diversen anderen Isoformen (Zeng 1998). Wird die Regulation von E-Cadherin reduziert, wird auch die Zell-Zell-Adhäsion verringert (Croce *et al.*, 2003; Reuning *et al.*, 1998). Generell gilt, dass schwach differenzierte Epithelzellen stärker zur Invasion neigen als gut differenzierte. Diese Beobachtung

wurde von Frixen *et al.*, 1991, bestätigt, die bei Maus-Mammakarzinomzellen (TA3) für die Adhäsionsproteine E-Cadherin und CD44 eine inverse Beziehung gefunden haben, wobei E-Cadherin als Invasions-Suppressor agiert. Zellen mit einer hohen E-Cadherin-Expression zeigen eine abgeschwächte Bindungs-Affinität zwischen CD44 und HA. Das blockiert die Ausbreitung der Zellen auf HA und die Tumorzellinvasion. Das Umschlagen der Balance zwischen CD44 und E-Cadherin sowohl hinsichtlich der Up-Regulation der CD44-Funktion als auch der Down-Regulation des E-Cadherin-Spiegels kann eine Tumorausbreitung und Metastasierung fördern (Xu und Yu, 2003).

Obwohl Blut-Monozyten eine signifikante zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen besitzen, werden tumorinfiltrierte Monozyten häufig deaktiviert. Monozyten, die Tumorzellen gegenüber exponiert wurden, zeigten signifikant niedrige Expressionslevel von TNF- α , IL-12p40 und IL-1R-assoziiierter Kinase (IRAK)-1. Die Aktivierung der Ser/Thr-Kinase IRAK-1 ist ein wichtiges Ereignis bei verschiedenen inflammatorischen Prozessen. Im Gegensatz dazu reguliert ein anderes Mitglied der IRAK-Familie, IRAK-M, negativ diesen Stoffwechselweg und wird in Kulturen von Endotoxin-toleranten Monozyten und bei Monozyten von Sepsis-Patienten up-reguliert. Del Fresno *et al.*, 2005, zeigten, dass die IRAK-M-Expression auf dem mRNA und Protein-Level in menschlichen Monozyten, die mit Tumorzellen kultiviert werden, gefördert wird. IRAK-M wurde mittels Co-Kultur mit verschiedenen Tumorzellen induziert. Blut-Monozyten von Patienten mit chronischer Knochenmarks-Leukämie und Metastasierung überexprimierten IRAK-M. Geringe Konzentrationen von HA regulierten IRAK-M hoch. Die Induktion von IRAK-M durch HA und Tumorzellen wurde durch Inkubation mit anti-CD44 oder anti-TLR4-blocking-Abs aufgehoben. Außerdem setzte die Down-Regulation der IRAK-M-Expression durch kleine RNAs, die für IRAK-M spezifisch sind, sowohl die TNF- α -mRNA-Expression und Proteinproduktion in menschlichen Monozyten, die einer Tumorzelllinie wieder ausgesetzt waren, herab. Die Deaktivierung humaner Monozyten in der Gegenwart von Tumorzellen involviert die IRAK-M-Up-Regulation. Dieser Effekt scheint durch HA über die Interaktion mit CD44 und TLR4 vermittelt zu sein.

HA soll bei drei Aspekten der Invasionsfähigkeit von Metastasen eine Rolle spielen: Zunächst bildet HA stark hydratisierte, dehnbare Matrices, die Änderungen in der Zellform und der Gewebepenetration unterstützen. Außerdem sorgt HA für die Regulation der Produktion und Zelloberflächenpräsentation von Proteasen und induziert die Neuordnung des Zytoskeletts (zusammengefasst von Toole, 2004).

In einigen Publikationen wird eine endogene Färbung von HA oder eine intrazelluläre Bindung von HA oder HA-bindenden Proteinen beschrieben (Turley and Torrance, 1985; Turley *et al.*, 1990; Eggli und Graber, 1995). Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass HA von Zellen internalisiert wird und auf der intrazellulären Seite der Membranen in kürzester Zeit von Hyaluronidasen degradiert wird (McGuire *et al.*, 1987; McGary *et al.*, 1989; Fraser *et al.*, 1997; Menzel und Farr, 1998).

Das Zytoskelett besteht in erster Linie aus Proteinfilamenten, die im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie bestehen aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten mit zahlreichen Funktionen. Sie spielen u.a. bei der Zellbewegung eine Rolle. Der HA-Rezeptor CD44 interagiert mit den zytosolischen Bestandteilen: die zytoplasmatische Domäne des CD44 soll mit dem Zytoskelett assoziiert sein und besonders mit den Aktinfilamenten interagieren, die intrazellulär zwischen Aktinfilamenten und einem HA-bindenden Protein verteilt sind (Turley *et al.*, 1990; Lacy und Underhill, 1987; Liu *et al.*, 1996). Der RHAMM/IHABP-Rezeptor, der ebenfalls HA bindet, kommt ausschließlich intrazellulär vor (Hofmann *et al.*, 1998; Assmann *et al.*, 1998). Der Rezeptor soll mit dem Zytoskelett und hier besonders mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten interagieren (Assmann, 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt es nahe, dass auch endogene HA an Zellfunktionen beteiligt ist und über endogen vorhandene HA-Rezeptoren die Zellmigration beeinflussen kann.

Die meisten Tumore und Metastasen entstehen als kleine avaskuläre Zellhaufen, die bei Überschreitung einer bestimmten Größe die Entwicklung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßsystemen induzieren (Hudlicka, 1991; Holash *et al.*, 1999).

Es ist bekannt, dass Blutgefäße durch Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie durch die Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten die Progression und Metastasierung von Tumoren fördern (Schor und Schor, 1983; Blood und Zetter, 1990; Hanahan und Folkman, 1996). Aufgrund von Experimenten mit dem Cornea-Modell

wird allgemein angenommen, dass die gerichtete Migration von Kapillaren zu Tumoren durch Chemotaxis bedingt ist. In diesem Modell konnte in der avaskulären Hornhaut von Kaninchen direktionales Wachstum von vaskularisiertem Gewebe auf implantiertem Tumor oder auf lokalen Ablagerungen von Angiogenesefaktoren festgestellt werden (Ausprunk und Folkman, 1977).

Nach Pötgens *et al.*, 1995, ist der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder auch „vascular permeability factor“ (VPF) genannte Faktor an der Chemoattraktion von Endothelzellen beteiligt (Roberts und Palade, 1997, Esser *et al.*, 1998).

Chemokine, die von Tumoren sezerniert werden, können auf unterschiedliche Weise eine gerichtete Migration von Endothelzellen auslösen. Einerseits können sie das direktionale Auswachsen von Kapillarsprossen direkt durch Chemotaxis stimulieren (Yoshida *et al.*, 1996). Andererseits können die Faktoren der Tumorzellen eine Gefäßleckage verursachen. Die anschließende lokale Extravasation von Fibrinogen und einer Vielzahl anderer Plasmafaktoren kann dann zu einem Einwachsen von Kapillaren in die Richtung des Tumors führen. Eine Bestätigung dieser zweiten Hypothese findet sich in der Tatsache, dass Gefäßwachstum in soliden Tumoren häufig an Orten lokalisiert ist, an denen zuvor eine Plasmaextravasation stattgefunden hat (Skinner *et al.*, 1990). Fibrin alleine ist schon ausreichend, um die Angiogenese zu stimulieren (Dvorak *et al.*, 1979; Nehls und Herrmann, 1996). Außerdem werden während der Plasmaextravasation noch viele Wachstumsfaktoren freigesetzt, die ihrerseits wiederum das Gefäßwachstum stimulieren. Viele Neoplasmen enthalten durch einen Mangel an Thrombinaktivität ausschließlich Fibrinogen (Costantini und Zacharski, 1993), das alleine jedoch auch in der Lage ist, eine direktionale Migration von Endothelzellen auszulösen (Dejana *et al.*, 1985). So könnte die gerichtete lokale Plasmaextravasation auch eine Erklärung für die direktionale Migration von Endothelzellen auf Tumorzellen *in situ* sein.

Hayen, 2001, zeigte, dass HA auch intrazellulär perinukleär mit dem Zytoskelett assoziiert vorliegt. Ein direkter Einfluss, wie ihn HA auf Fibrinogen und die Fibrinpolymerisation ausübt, konnte zwischen endogener HA und Aktinpolymerisation jedoch nicht gefunden werden.

Thomas *et al.*, 1993 zeigten, dass der Rezeptor CD44 eine Rolle bei der *in vivo*-Stimulierung der Aggressivität von Tumoren durch ein hyaluronatreiches Stroma spielt.

Die Migration von Zellen scheint über die Aktivierung einer RhoGase durch HA-Bindung kontrolliert zu werden. Die Aktivierung von RhoA, Cdc42 führt zur Bildung von Stressfasern, fokalen Adäsions-Plaques, Lamellipoden, Microspikes und „membrane-ruffling“ in Fibroblasten. In einer Brust-Epithelzellen-Maus (Eph4) aktivierte die Bindung von HA an CD44 Rac1 und induzierte die Bildung von Lamellipoden, die durch anti-CD44-mAbs oder Mikroinjektionen mit einer dominanten negativ-Mutante von Rac inhibiert werden konnten (Oliferenko *et al.*, 2000).

Trotzdem scheint die HA-CD44-Interaktion nicht für Tumorwachstum und Metastasierung in Ratten-Pankreas-Karzinom-Zelllinien nötig zu sein (Sleeman *et al.*, 1996). Das CD44v4-7-Transfekt zeigte eine erhöhte HA-Bindung verglichen mit der Wirtslinie. Wurde die Bindungsfähigkeit von HA durch Transfektion von Hyaluronidase-cDNA beseitigt, behielten die Zellen die Fähigkeit, lokales Tumorwachstum und Lungenmetastasen zu induzieren (Sleeman *et al.*, 1996). In diesem Fall sind Tumorwachstum und Metastasierung unabhängig von der HA-CD44-Interaktion.

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) spielen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Tumors, indem die Proteolyse verschiedener Matrix-Komponenten induziert wird (Werb, 1997). CD44 ist für die Funktion der MMPs nötig.

Die Akkumulation von HA in Tumoren und im Tumor-assoziierten Stroma fördert die Tumorzelleninvasion und Metastasierung. Mittels „Dunn Chamber chemotaxis assay“ zeigten Tzircotis *et al.*, 2005, dass hochmolekulares HA wie ein löslicher Chemoattractant wirkt, der die directionale Migration von MDA-MB-468 und MDA-MB-231-Brustkrebszellen fördert. Mehr noch, Chemotaxis zu HA, aber nicht zu fetalem Serum Bovin kann durch eine Behandlung der Zellen mit siRNA-Oligonucleotiden aufgehoben werden, wobei die CD44-Expression heruntergefahren wird. Dies zeigt, dass CD44 der eigentliche Faktor ist, der diese Antwort reguliert und dass die CD44-Expression nicht generell nötig zur Zellmigration und „gradient sensing“ ist. Die CD44-Expression allein ist aber nicht in der Lage, die HA-Chemotaxis zu steuern, da NIH-3T3-

Fibroblasten nicht fähig waren, auf einen HA-Gradienten zu reagieren, auch wenn sie mit großen Mengen an humanem CD44 transfektiert wurden. Damit NIH-3T3-Zellen exogenes HA binden, war es nötig, dass sowohl die Level der Rezeptor-Expression stiegen als auch die perizelluläre HA-Matrix abzubauen. Zusammen genommen zeigen diese Studien, dass ein direkter Mechanismus, der die Zellinvasion in die HA-reiche Matrix fördert, existiert, um die Fähigkeit einer Zelle auf einen chemotaktischen HA-Gradienten zu reagieren, zu regulieren.

Diese genannten bisher bereits bekannten Wirkungsmechanismen sind prinzipiell geeignet, Einfluss auf das Wachstum, Infiltrations- und Metastasierungsverhalten von Malignomen zu nehmen. Es gibt zahlreiche Versuche, Hyaluronat als Indikatorsubstanz für Tumoruntersuchungen einzusetzen, z. B. als Indikator der progressiven Tumorerkrankung (Dahl *et al.*, 1989).

Wang *et al.*, 1996 untersuchten die Verteilung von HA in „normalem“ Gewebe und Tumor-Epithelzellen des Ösophagus, Magens und Darms. In gesundem Gewebe des Ösophagus-Epithels zeigte sich eine starke Hyaluronfärbung in basalen und unteren mittleren Schichten, während die einfachen Epithelien im Magen und Verdauungstrakt HA negativ waren. Karzinome des Ösophagus exprimierten *in situ* in den Zellschichten, die dicht neben der luminalen Oberfläche lagen, HA, also in Bereichen, die sonst HA-negativ sind. Das Stromagewebe in allen Tumoren war HA-positiv. Insgesamt wurde festgestellt, dass gut ausdifferenzierte Karzinome selbst ihre hohen oder niedrigen HA-Expressionsmuster regulieren, während Tumore die Abscheidung von HA in das umgebende Stroma stimulieren.

Auch CD44 kann im Serum nachgewiesen werden. Da die Tumorprogression zur erhöhten Expression von CD44 führt, sollte untersucht werden, ob es Unterschiede im Muster des Oberflächenproteins CD44 im Serum zwischen einer gesunden Kontrollgruppe und Tumorpatienten gibt. Weiß *et al.*, 1995, beschrieben einen Nachweis für CD44 im Serum.

Es soll im Folgenden exemplarisch an Hand von Magen- und Pankreaskarzinomen untersucht werden, ob sich in den jeweiligen untersuchten Gruppen spezifische Muster hinsichtlich der Verteilung, Konzentration und Molekülstruktur der HA nachweisen lassen.

Dazu wurde die Hyaluronatverteilung über eine Verteilungschromatografie aus dem Serum der Patienten und gesunden Probanden bestimmt und miteinander verglichen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, wie sich Hyaluronat und CD44 im Gewebe („Normalgewebe“, Tumor, und Infiltrationsbereich des Tumors) verteilen.

Sollten sich hier spezifische und repräsentative Verteilungsmuster nachweisen lassen, könnte dies einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen von Tumorwachstum und –infiltration darstellen. Ferner könnten sich aus solchen Verteilungsmustern neue Angriffsmöglichkeiten für die Tumorthherapie ergeben.

B. Methodik

I. Bestimmung des Hyaluronatgehaltes im Serum mit einem ELISA-ähnlichen Assay

Die vom Patienten stammende Vollblutprobe wird zur Herstellung von Serum 15 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Serum kann dann abpipettiert und sofort verwendet oder bei –18°C zur späteren Bearbeitung eingefroren werden.

Die Messung erfolgt auf einer Covalink-NH Microwell Messplatte, die vor der Messung mit Hyaluronat beschichtet werden müssen.

Hierzu werden 0,184 mg N-Hydroxysulfosuccinid (S-NHS) pro ml HA-Lösung (Healon der Firma Pharmacia&Upjohn im Verhältnis 1:5 mit aqua dest. verdünnt) und 1,23 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) pro ml in dH₂O in gleichem Verhältnis direkt vor dem Befüllen der Platte gemischt.

Jede Welle der Platte wird mit 100µl dieser Lösung befüllt und die Platte dann bei 4°C über Nacht oder bei Zimmertemperatur für 2 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wird das Reagens aus der Platte ausgeschüttelt und jede Welle 3 mal mit Puffer A (1l Puffer enthält 116,88g NaCl, 10,0g MgSO₄·7H₂O, 100 ml PBS-CMF (10fach konzentriert) und dH₂O) ausgewaschen. Ein Liter einfach konzentrierter PBS-CMF Puffer enthält 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,0g KH₂PO₄ und dH₂O bei einem pH von 7,0-7,5.

Währenddessen werden jeweils 3 Fraktionen der Proben und Standardlösungen a 75µl mit 50 µl biotinyliertem Hyaluronat-Bindungsprotein (HABP der Firma Seikagaku 1:200 verdünnt in HABP-Puffer: 21,91g NaCl, 7,165g GuHCl, 0,200g bovines Serum Albumin BSA und 0,050g NaN₃ werden mit dH₂O auf 225 ml Volumen aufgefüllt und dann mit 0,25M Na₂HPO₄·2H₂O und 0,25M NaH₂PO₄·H₂O auf einen pH Wert von 7,0 titriert) bei 37°C für 1 Stunde in einer zweiten Covalink-NH microwell Messplatte inkubiert.

Für die Standardlösungen wird Healon mit seinem bekannten Hyaluronat-Gehalt so mit PBS-CMF verdünnt, dass die Hyaluronat-Konzentrationen 3000 ng/ml, 1200 ng/ml, 600 ng/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml, 40 ng/ml und 15 ng/ml erreicht werden. Diese Konzentrationen wurden gewählt, weil sie dem zu erwartenden Messbereich entsprechen, sind jedoch nicht verbindlich zu verwenden.

Außerdem werden auf jeder Platte eine Positivkontrolle mit 50µl HABP und 75µl PBS-CMF, und eine Negativkontrolle mit 125µl PBS-CMF alleine, eingeschlossen.

Im nächsten Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der beschichteten Platte geblockt. Hierzu wird der Puffer A aus der Platte ausgeschüttelt und jede einzelne Welle mit jeweils 300 µl eines Blocker Reagens aufgefüllt und für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Als Blocker wird eine Lösung aus 1 mg bovines Serum Albumin BSA pro ml PBS-CMF Puffer verwendet. Pro Platte werden somit ca. 30 ml dieser Lösung benötigt.

Nach erfolgter Inkubation wird die Blockerlösung ausgeschüttelt und die Platte mit Puffer B (entspricht Puffer A mit 0,05 % Tween 20) 3-mal ausgewaschen und erneut gründlich ausgeschüttelt. Nun werden pro Welle 100 µl der Proben (jeweils 3 pro Standardlösung und Probandenserum zur Mittelwertbildung) in die Platte eingefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Danach können die Proben ausgeschüttelt und die Platte erneut 3-mal mit Puffer B gespült werden, bevor pro Welle 100 µl ABC Reagens zugegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert wird. Das ABC Reagens muss mindestens 30 min. vor Benutzung angesetzt werden. Hierzu werden je 2 Tropfen Avidin- und Biotinlösung des Vectastain ABC Peroxidase Standard Kits der Firma Vector Labs in 10 ml PBS-CMF und 0,1 % Tween 20 zugegeben.

In der Zwischenzeit werden 3 o-PD Tabletten (2 mg Dihydrochloridtabletten der Firma Calbiochem) in 12 ml 0.1M Citrat-Phosphat Puffer (pH 5,3) aufgelöst.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das ABC ausgeschüttelt, die Platte 5-mal mit Puffer B gründlich ausgewaschen und der o-PD Lösung 6µl einer 30 %igen H₂O₂-Lösung zugegeben. Unmittelbar danach ist die Platte zum Anstoßen der Peroxidasefarbreaktion pro Welle mit 100 µl dieser Lösung zu bestücken und für 15 bis 25 Minuten (im Rahmen dieser Arbeit wurden standardmäßig exakt 20 Minuten gewählt) in Dunkelheit zu entwickeln. Nach Ablauf der gewählten Reaktionszeit wurde

die optische Dichte der jeweiligen Proben bei 490 nm Wellenlänge mit einem ELISA Messgerät des Typs Vmax Kinetic Microplate Reader der Firma Molecular Devices gemessen. Aus den optischen Dichten der Standardproben kann dann bei deren bekannter HA-Konzentration eine Standardmesskurve erstellt werden, so dass sich die Konzentration an Hyaluronat im jeweiligen Serum aus der Lage des optischen Dichtewertes auf dieser Kurve ergibt.

II. Molekülgrößendifferenzierung mittels Gelfiltration und ELISA-ähnlichem Assay

Die Molekülgrößendifferenzierung erfolgte als qualitative Methode mittels Gelfiltration (Porath und Flodrin, 1959, Andrews 1965, Andrews 1970, Potschka *et al.*, 1987). Hierzu wurde eine 50 cm lange und 10 mm im Durchmesser messende Chromatographiesäule der Firma Pharmacia Biotech mit den zugehörigen Adaptoren SRA 10 der Firma Pharmacia Fine Chemicals verwendet. Die Säule wurde entsprechend des zu erwartenden Bereiches der bekannten Molekülgrößen von Hyaluronat mit einem 40 cm hohen Bett aus Sepharose CL 4B (von Pharmacia Biotech) bestückt. Sepharose CL 4B ist für einen Molekülgrößenbereich zwischen 60 kD und 20 MD geeignet und weist zwischen pH 3 und pH 13 eine ausreichende chemische Stabilität auf.

Als Fraktionensammler wurde das Modell LKB 2070 UltroRac II mit Tropfenzähler der Firma LKB gewählt und als Flüssigkeitspumpe fand eine peristaltische Pumpe, Modell P-3 von Pharmacia Verwendung. Als Spülflüssigkeit wurde PBS-CMF Puffer verwendet.

Für den erfolgreichen Ablauf und die Vergleichbarkeit der Messungen sind das blasenfreie Auffüllen des Säulenbettes und die exakte, immer gleich bleibende Säulenhöhe, in unserem Fall 40 cm, entscheidend.

Die Fraktionierung erfolgte an jeweils 1 ml Probandenserum, das auf oben bereits beschriebene Weise gewonnen wurde. Die Probe wurde bei exakt senkrecht stehender Säule und verschlossenem unteren Auslassadapter auf das Säulenbett gefüllt und die Säule dann mit dem oberen Adapter druckdicht verschlossen. Hierbei soll der obere

Adapter unmittelbar mit dem Flüssigkeitsspiegel der Serumprobe abschließen, ohne ein größeres Luftreservoir mit einzuschließen, um eine direkte Drucktransmission durch die Pumpe zu ermöglichen. Dann wurde der untere Adapter geöffnet und die peristaltische Pumpe mit einer mittleren Flussgeschwindigkeit (Stufe 6) in Gang gesetzt. Mittels des Fraktionensammlers und des angeschlossenen Tropfenzählers wurden die ersten 100 Tropfen verworfen und sodann 72 Fraktionen von jeweils 20 Tropfen Größe gewonnen. Die ersten 100 Tropfen können gemäß den in unseren Vorexperimenten zur Kalibrierung des Versuchsaufbaus gewonnen Ergebnissen verworfen werden, da in ihnen noch kein messbarer Anteil an Hyaluronat zu erwarten ist. Des Weiteren wurden die Fraktionsgröße von 20 Tropfen und die Zahl der Fraktionen mit 72 so gewählt, dass mit ihnen die Erfassung des gesamten Molekülgrößenspektrums von Hyaluronat bei größtmöglicher Auflösung möglich ist. Größere Moleküle wandern hierbei schneller durch das Gelbett als kleine, so dass die Molekülgröße des in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Hyaluronats gemäß dem Prinzip der Gelfiltration mit zunehmender Zahl der Fraktionen im Verlauf abnimmt.

Die Konzentration an Hyaluronat in den einzelnen Fraktionen wurde dann mit oben bereits beschriebenem ELISA-ähnlichem Assay bestimmt.

III. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat

Zur Immunhistochemischen Färbung von Hyaluronat wurden paraffinfixierte Schnitte auf mikroskopischen Objektträgern von operativ gewonnenem Gewebe verwendet.

Zunächst waren die Schnitte zu entparaffinieren und hydratisieren. Hierzu wurden die Schnitte einmal für zehn und noch einmal für fünf Minuten in ein Xylolbad getaucht, sowie danach nochmals für jeweils fünf Minuten in Bäder aus jeweils gleichen Teilen Xylol und 100 %igem Ethanol, 100 % iger Ethanollösung, 95 %iger Ethanollösung und PBS-CMF Puffer.

Im nächsten Schritt erfolgte die Blockung endogener Peroxidaseaktivität indem die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in eine Lösung aus 55 ml Methanol mit 40 ml destilliertem H₂O und 5 ml 30 %igem H₂O₂ getaucht wurden. Danach wurden die Schnitte für 20 Minuten in PBS-CMF mit 0.05 % Tween 20 gewaschen.

Zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte anschließend für 30 Minuten bei 37°C in 5 %igem Ziegsenserum (Normal Goat Serum, Vector Labs) gelöst in PBS-CMF und 0,2 % Tween 20 inkubiert. Nach dem Abtropfen dieser Lösung wurde für jeweils 15 Minuten Avidin D und Biotin Blockerlösung (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Labs) auf die Objektträger gegeben, die danach kurz mit PBS-CMF Puffer abgespült und dann mit ca. 0,3 ml einer Lösung des Hyaluronatbindungsproteins pro Objektträger bei 4°C über Nacht in einer feuchtigkeitsgesättigten Umgebung inkubiert wurden. Das Bindungsprotein (B-HABP, Seikagaku Corporation) wurde in Lösung im Verhältnis 1:100 in destilliertem H₂O verwendet.

Nach ausreichender Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 mal für jeweils 5 Minuten in PBS-CMF Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen und danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem ABC Peroxidase Komplex inkubiert. Hier wurden je ein Tropfen der einzelnen Reagenzien des Vectastain ABC Kit Peroxidase Standard, Vector Labs, pro 5 ml PBS-CMF mit 0,2 % Tween 20 verwendet (diese Lösung ist mindestens 30 Minuten vor Benutzung anzusetzen). Im Anschluss wurden die Objektträger nochmals 3-mal für jeweils 5 Minuten in PBS-CMF mit 0,2 % Tween 20 gespült.

Unmittelbar vor Verwendung wurde dann die Peroxidase Substratlösung angesetzt, die aus 9,5 ml dH₂O bestand, dem jeweils 4 Tropfen Puffer, 8 Tropfen Reagens und 4 Tropfen H₂O₂ aus dem DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Labs, zugesetzt wurden. Die Schnitte wurden dann für 8 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert und danach für 5 Minuten in dH₂O gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 45 Sekunden mit Hämalaun, das anschließend mit dH₂O und PBS-CMF ausgewaschen wurde. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte abschließend für jeweils 5 Minuten in Bäder mit 70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol, 100 % Ethanol/Xylol und 2-mal reinem Xylol getaucht.

IV. Immunhistochemische Färbung von CD 44

Auch hier wurden paraffinfixierte Schnitte von operativ gewonnenem Gewebe verwendet, die auf gleiche Weise wie die Schnitte zur Färbung von Hyaluronat entparaffiniert und hydratisiert wurden. Anschließend wurden diese für 15 Minuten in

10 mM Citrat-Puffer (500 ml Puffer enthielten 1,05 g Citratmonohydrat und dH₂O bei pH 6,0) bei halber Leistung in einem Mikrowellenofen inkubiert und nach ausreichender Abkühlung für 5 Minuten in PBS-CMF gewaschen.

Zur Blockung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung bestehend aus 5 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid und 95 ml PBS-CMF mit 0,2 % Tween 20 inkubiert und danach für 20 Minuten erneut in PBS-CMF gewaschen. Das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte wiederum durch Inkubation mit 5 %igem Ziegen Serum in PBS-CMF mit 0,2 % Tween 20 bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte wie oben bereits beschrieben für jeweils 15 Minuten mit Avidin D und Biotin Blockerlösung beträufelt.

Als Primärantikörper wurden von Mäusen gewonnene, gegen menschliches CD 44 gerichtete Antikörper verwendet (Mouse Anti Human CD 44, Serotec). Diese wurden in Verdünnung im Verhältnis 1:100 in 5 %igem Ziegen Serum in PBS-CMF auf die Schnitte appliziert; zunächst erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C.

Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in PBS-CMF gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper gegen Maus IgG (Biotinylated Anti-Mouse IgG, Vector Labs). Diese wurden wiederum in Lösung in 5 %igem Ziegen Serum in PBS-CMF aufgebracht, und zwar für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Verdünnung im Verhältnis 1:200.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte für 10 Minuten in PBS-CMF mit 0,05 % Tween 20 gewaschen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur ein ABC Peroxidasekomplex (Vectastain ABC Kit Elite Peroxidase Standard, Vector Labs) appliziert. Die Zubereitung dieses Peroxidasekomplexes muss mindestens 30 Minuten vor Gebrauch erfolgen und es wurden jeweils 2 Tropfen der einzelnen Reaktionslösungen auf 5 ml PBS-CMF mit 0,1 % Tween 20 verwendet. Nachdem die Schnitte dann einmal für 10 Minuten in PBS-CMF alleine und für nochmals 5 Minuten in PBS-CMF mit 0,05 % Tween 20 gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem DAB Peroxidase Substrat wie oben bereits beschrieben für 9 Minuten bei Raumtemperatur. Sofort im Anschluss wurden die Schnitte für 5 Minuten in dH₂O

gewaschen und es erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun und die Dehydrierung wie oben ebenfalls schon vorbeschrieben.

V. Mikroskopische Beurteilung und fotografische Dokumentation

Sämtliche histologischen Präparate wurden nach der jeweiligen immunhistologischen Färbung an einem Mikroskop des Typs BX 40 der Firma Olympus beurteilt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Photographien, ob tatsächlich gezeigt oder bei der Auswertung berücksichtigt, entstanden am selben Mikroskop mit Fotoaufsatz und einer Kamera, Modell SC 35, Typ 12 der Firma Olympus. Als Filmmaterial kamen ausschließlich Diafilme der Firma Kodak, Typ Elite Chrome 160T Select Series, zur Anwendung.

Die mikroskopische Beurteilung und Auswertung aller untersuchten histologischen Präparate erfolgte ausschließlich durch den Autor, so dass eine durch unterschiedliche Untersucher verursachte Varianz der Bewertungskriterien ausgeschlossen wurde.

C. Ergebnisse

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse für die einzelnen angewandten Untersuchungsmethoden getrennt dargestellt. Unter I. werden die Ergebnisse der Hyaluronatbestimmung im Serum, unter II. die Ergebnisse der Molekülgrößendifferenzierung mittels Gelfiltration und unter III. und IV. die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Hyaluronat und CD 44 mit den beiden Untergruppen Magen- und Pankreaskarzinom aufgeführt.

I. Hyaluronatkonzentration im Serum

In der Kontrollgruppe gesunder Probanden mit $n = 33$ reichten die gemessenen Werte von 32,73 ng/ml bis 222,5 ng/ml, der errechnete Mittelwert lag bei 86,8 ng/ml. Die Konzentrationen bei den Magenkarzinompatienten mit $n = 27$ lagen zwischen 22,4 ng/ml und 251,0 ng/ml, im Mittel lagen die Werte bei 88,84 ng/ml. Für die Patienten mit Pankreaskarzinomen mit $n = 22$ lagen die gemessenen Extremwerte bei 37,04 ng/ml und 207,0 ng/ml, im Mittel lag die Konzentration bei 104,3 ng/ml.

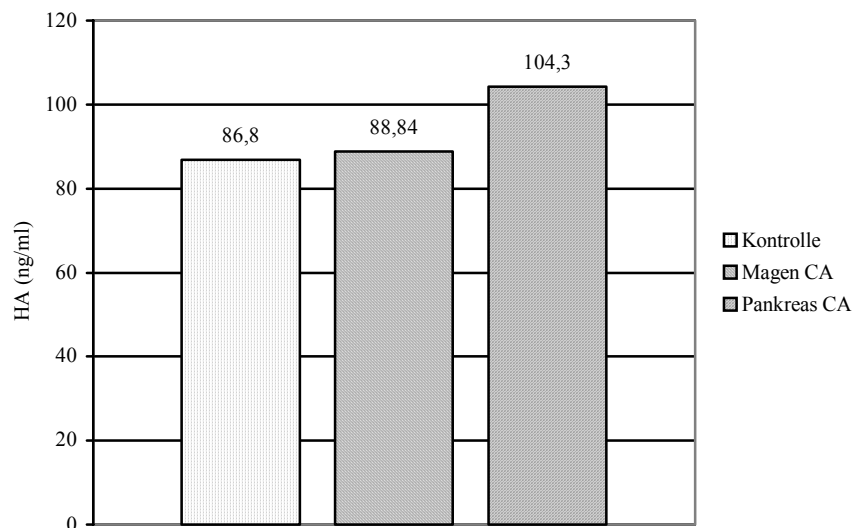


Abbildung 1: Konzentration von Hyaluronat im Serum in den drei Untersuchungsgruppen: Die Werte der Malignompatienten sind tendenziell höher als in der Kontrollgruppe, die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

II. Relative Molekülgrößendifferenzierung von Hyaluronat

Aus den drei untersuchten Probandengruppen wurden je drei Individuen zufällig ausgewählt, aus deren Sera eine relative Molekülgrößendifferenzierung von Hyaluronat (HA) durchgeführt wurde. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils einen für die jeweilige Gruppe repräsentativen Verlauf der Molekülgrößen.

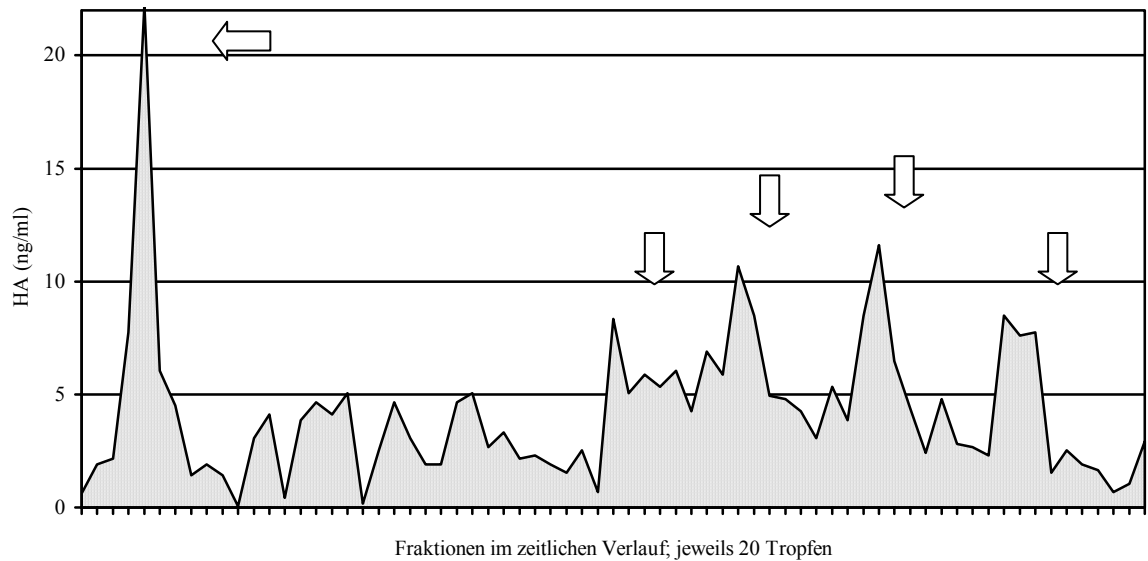


Abbildung 2: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Gesunden. Die Molekülgrößen nehmen im zeitlichen Verlauf in konstanten Schritten ab.

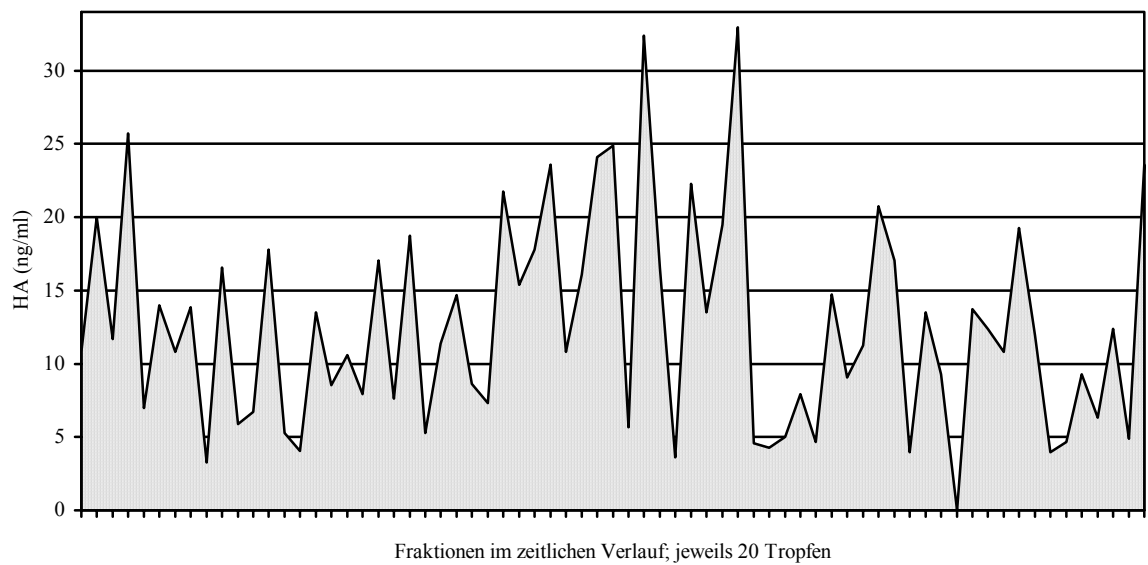


Abbildung 3: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Patienten mit Magenkarzinom.

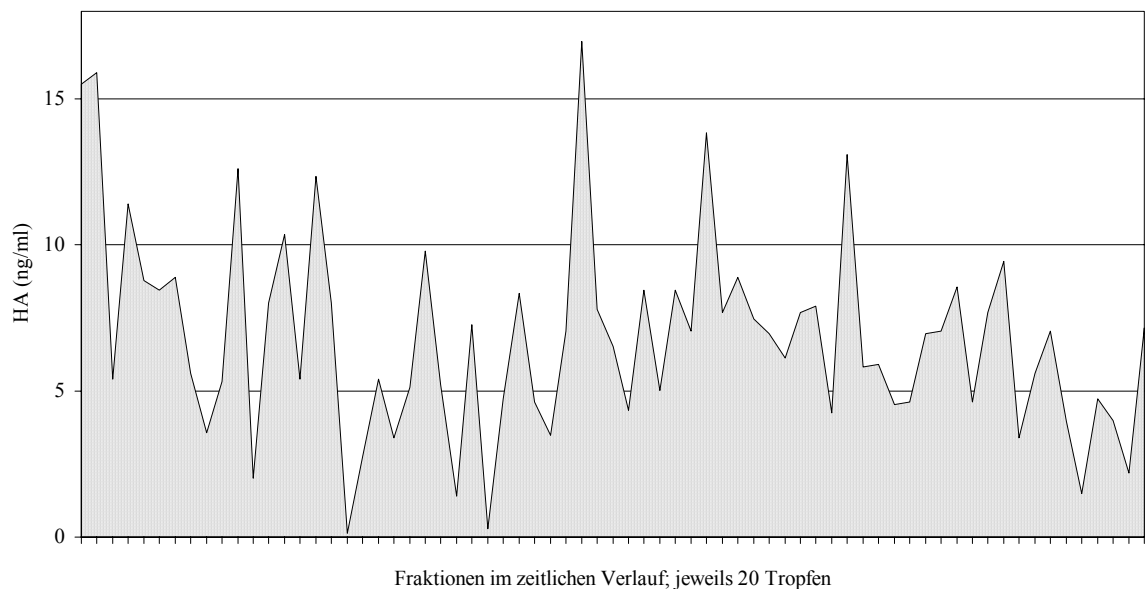


Abbildung 4: Verlauf der Hyaluronatkonzentrationen beim Patienten mit Pankreaskarzinom.

Aus Abbildung 2 ist ein repräsentativer Verlauf der Molekülgrößen von Hyaluronat beim gesunden Patienten ersichtlich. Es fällt gleich zu Beginn der Serie im hochmolekularen Bereich ein schmaler Peak auf, der in der gesamten Messungsreihe

auch die höchste Konzentration erreicht. Dann folgt bis in den mittleren Bereich des Spektrums ein unauffälliger Verlauf der Kurve mit Konzentrationen knapp über der Grenze der Messgenauigkeit. Ab dem mittleren Größenbereich schließen sich dann vier relativ schmale, klar abgegrenzte Peaks in regelmäßigen Abständen bis in den niedermolekularen Bereich an, deren Konzentrationsanteile im mittleren Größenbereich ansteigen und im niedermolekularen Anteil wieder abfallen.

Abbildung 3 zeigt den Verlauf beim Patienten mit Magenkarzinom. Hier ist der Peak im hochmolekularen Anteil deutlich verbreitert und im Verhältnis zum gesamten Konzentrationsverlauf ist dieser Anteil reduziert. Dafür erscheint die Hyaluronatkonzentration im mittleren und niedrigen Bereich der Molekülgrößen gegenüber dem gesunden Probanden erhöht, die vier vorbekannten Peaks in diesem Bereich sind nur noch ansatzweise erkennbar und verbreitert, die Konzentrationen in den Fraktionen zwischen den Peaks sind im Vergleich erhöht.

Abbildung 4 liefert ein ähnliches Bild für die Patienten mit Pankreaskarzinom. Auch hier ist der erste Peak erniedrigt und verbreitert, die Konzentrationen sind zum jeweils niedrigeren Molekularbereich hin verschoben und die vier gruppierten Peaks sind nur noch im mittleren Molekülgrößenbereich erkennbar.

III. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat und CD 44 an Präparaten von Magenkarzinomen

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte nach allgemein üblicher Methode (Wang et al. 1996), indem unterschieden wurde zwischen den Färbeintensitäten von „negativ“, wenn keinerlei Anfärbung nachweisbar war, über „einfach positiv“ bei leichter Anfärbung, „zweifach positiv“ bei mittelstarker, bis hin zu „dreifach positiv“ bei stärkster Anfärbung.

Des Weiteren wurden die jeweiligen Gewebsregionen hinsichtlich des Normalgewebes, des zentralen Tumoranteiles und des Infiltrationsrandes unterschieden. Innerhalb dieser Gruppen wurden Tumor- oder Organ-„Parenchym“ und bindegewebiges Stroma nach oben beschriebener Abstufung differenziert.

Die folgende Tabelle (Tabelle 1) fasst die untersuchten Fälle zusammen:

HA								
	Parenchym				Stroma			
	neg	pos	2xpos	3xpos	neg	pos	2xpos	3xpos
norm	16	5	0	0	0	4	14	3
TU	8	6	0	0	0	0	7	7
Infiltration	10	7	1	0	0	1	1	16
CD44								
	Parenchym				Stroma			
	neg	pos	2xpos	3xpos	neg	pos	2xpos	3xpos
norm	16	4	0	0	2	10	7	1
TU	8	1	1	2	2	5	4	1
Infiltration	12	7	0	0	1	5	7	6

Tabelle 1: Ergebnisse der Auswertung der untersuchten Präparate von Magenkarzinomen

Die Auswertung zeigt bei der Anfärbung von Hyaluronat für das Normalgewebe das erwartete Bild, ohne oder nur mit leichter Anfärbung des Organparenchyms, hier der regulären Magenschleimhaut. Das zugehörige bindegewebige Stroma zeigt im Wesentlichen eine leichte bis mittelgradige Anfärbung von Hyaluronat.

Die zugehörigen Färbungen von CD 44 liefern ebenfalls nur einen geringen Nachweis des Rezeptors im Parenchym und im bindegewebigen Stroma.

Das Färbemuster und die Intensität der Anfärbung von nicht malignem Gewebe zeigten dabei praktisch kaum Abweichungen von Patient zu Patient.

Bei den Schnitten durch das solide Tumorzentrum lässt sich Hyaluronat ebenfalls kaum nachweisen, die Färbeintensität im zugehörigen Stroma ist tendenziell stärker als bei nicht malignen Vergleichspräparaten (Abbildung 5).

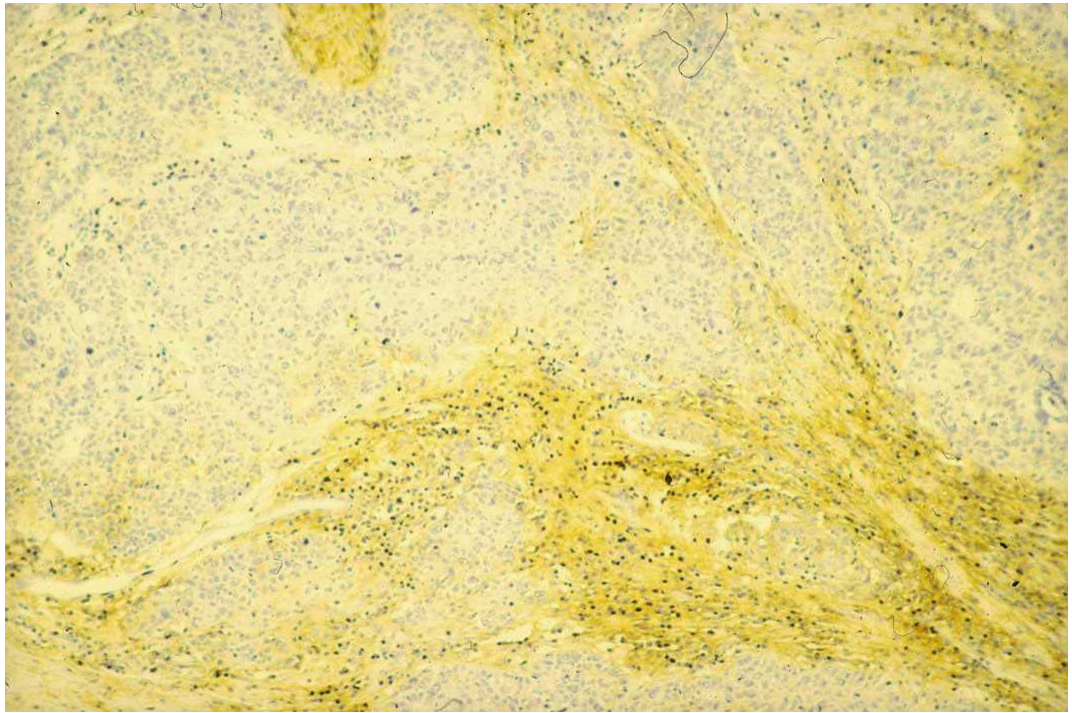


Abbildung 5: HA-Färbung, Magenkarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:40, 3-11

Bei CD 44 gilt dies im „Tumorparenchym“ entsprechend, im zugehörigen bindegewebigen Stroma ließ sich ein signifikanter Unterschied zu nicht malignen Vergleichspräparaten nicht nachweisen (Abbildung 6).

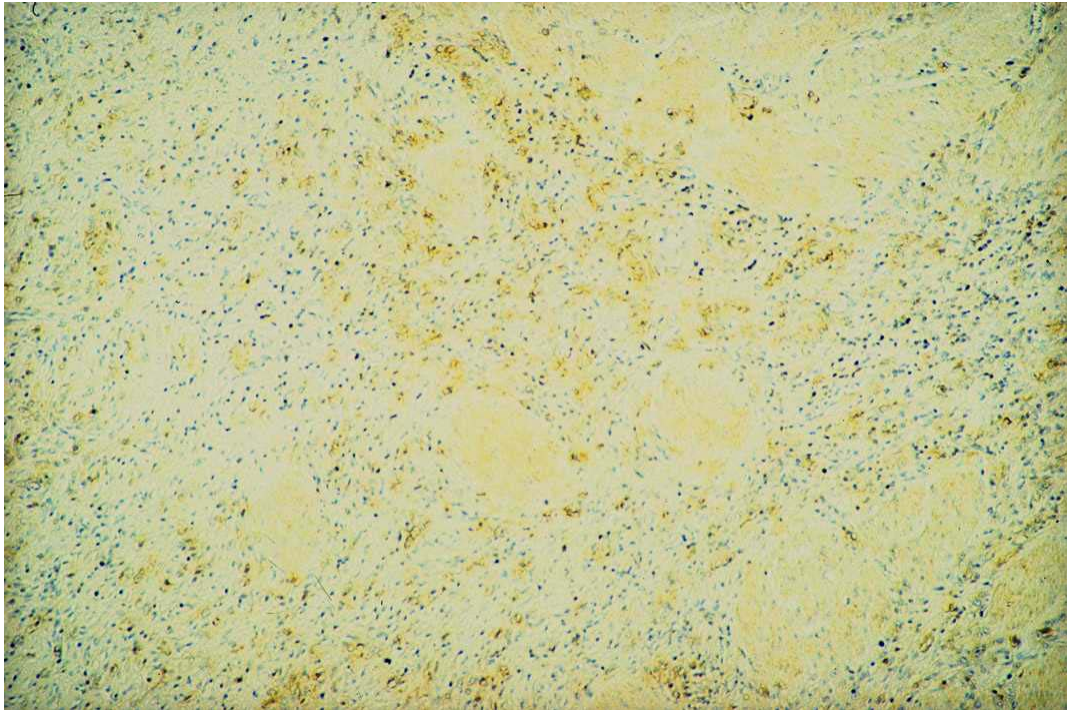


Abbildung 6: CD 44-Färbung, Magenkarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:100, 5-28

Wesentlich deutlicher zeigt sich diese Verteilung im Bereich des Infiltrationsrandes des Tumors, hierbei werden im Stroma für Hyaluronat und CD 44 die höchsten Färbeintensitäten erreicht, während auch hier das „Tumorparenchym“ nur geringen Nachweis von Hyaluronat und seinem Rezeptor erreicht (Abbildung 7 und Abbildung 8).

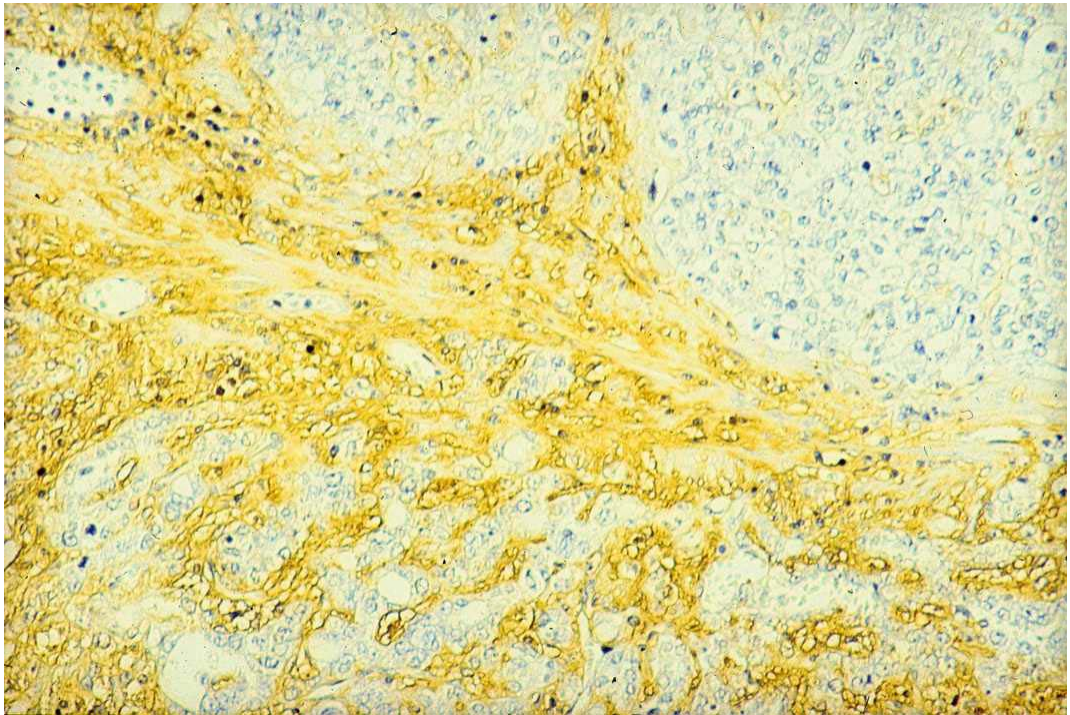


Abbildung 7: HA-Färbung, Magenkarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößerung 1:200, 5-6

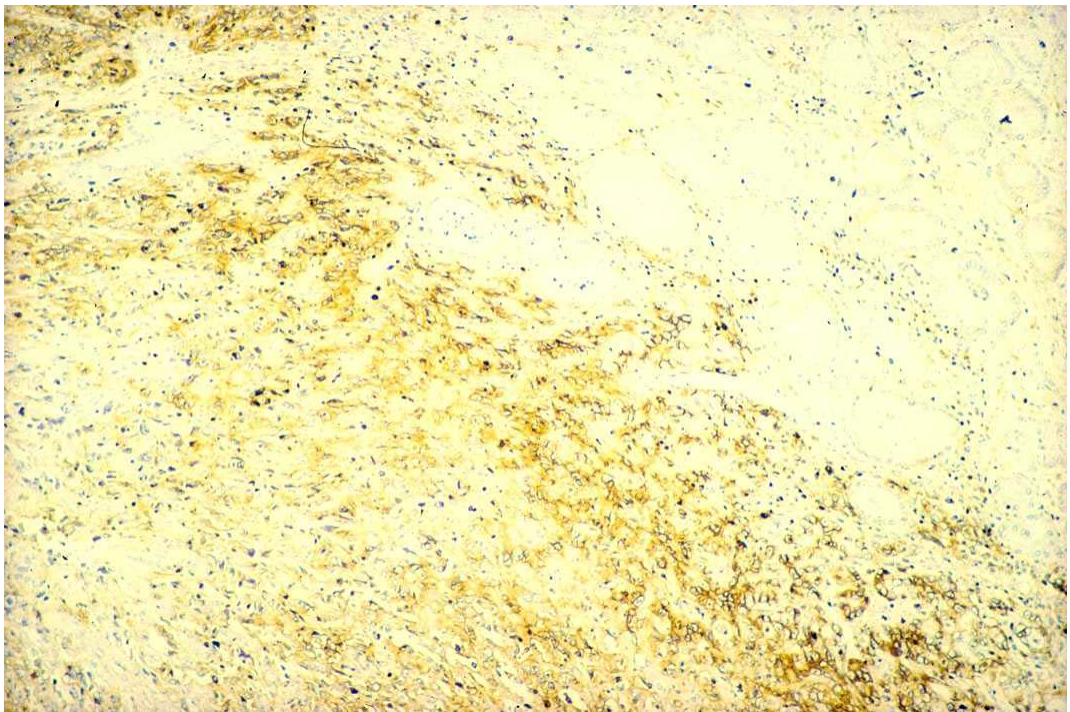


Abbildung 8: CD 44-Färbung, Magenkarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößerung 1:100, 5-16

IV. Immunhistochemische Färbung von Hyaluronat und CD 44 an Präparaten von Pankreaskarzinomen

Für die Beurteilung von Schnitten von Pankreaskarzinomen wurde dasselbe Schema angewandt wie oben bereits für die Magenkarzinome beschrieben.

Die nachfolgende Tabelle fasst auch hier die Ergebnisse der Auswertung zusammen:

HA								
	Parenchym				Stroma			
	neg	pos	2xpos	3xpos	neg	pos	2xpos	3xpos
norm	6	2	0	0	0	3	4	1
TU	10	1	0	1	0	1	6	5
Infiltration	13	4	0	0	0	2	5	10
CD 44								
	Parenchym				Stroma			
	neg	pos	2xpos	3xpos	neg	pos	2xpos	3xpos
norm	2	3	2	0	5	2	0	0
TU	4	2	2	1	3	5	1	0
Infiltration	12	3	0	1	6	6	4	0

Tabelle 2: Ergebnisse der Auswertung der untersuchten Präparate von Pankreaskarzinomen

Die Anfärbungen von Hyaluronat erbrachten im gesunden Organparenchym kaum den Nachweis von Hyaluronat, während das bindegewebige Stroma eine leichte bis mittelgradige Färbeintensität aufweist. CD 44 ist im normalen Organparenchym, aber auch im Stroma nur sehr schwach nachzuweisen.

Auch im Zentrum des malignen Tumors findet sich Hyaluronat nur in geringen Mengen, während es im umgebenden Stroma gegenüber nicht malignem Gewebe eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Färbeintensitäten gibt (Abbildung 9). Die zugehörigen Schnitte mit Färbungen von CD 44 zeigten ein entsprechendes Muster mit nur geringem Nachweis des Rezeptors im Tumorzentrum und aber im Vergleich zur nicht malignen Gruppe deutlich stärkerem Nachweis im Stroma (Abbildung 10).

Am deutlichsten zeigt sich diese Tendenz im Bereich des Infiltrationsrandes der Tumorzellen. Auch hier bleibt der Bereich der soliden Tumorzellaggregate ohne

größeren Nachweis von Hyaluronat (Abbildung 11), während das entsprechende Stroma die höchsten Färbintensitäten erreicht. CD 44 folgt im Wesentlichen diesem Verteilungsmuster und erreicht ebenfalls im Stroma die höchsten Intensitäten (Abbildung 12).

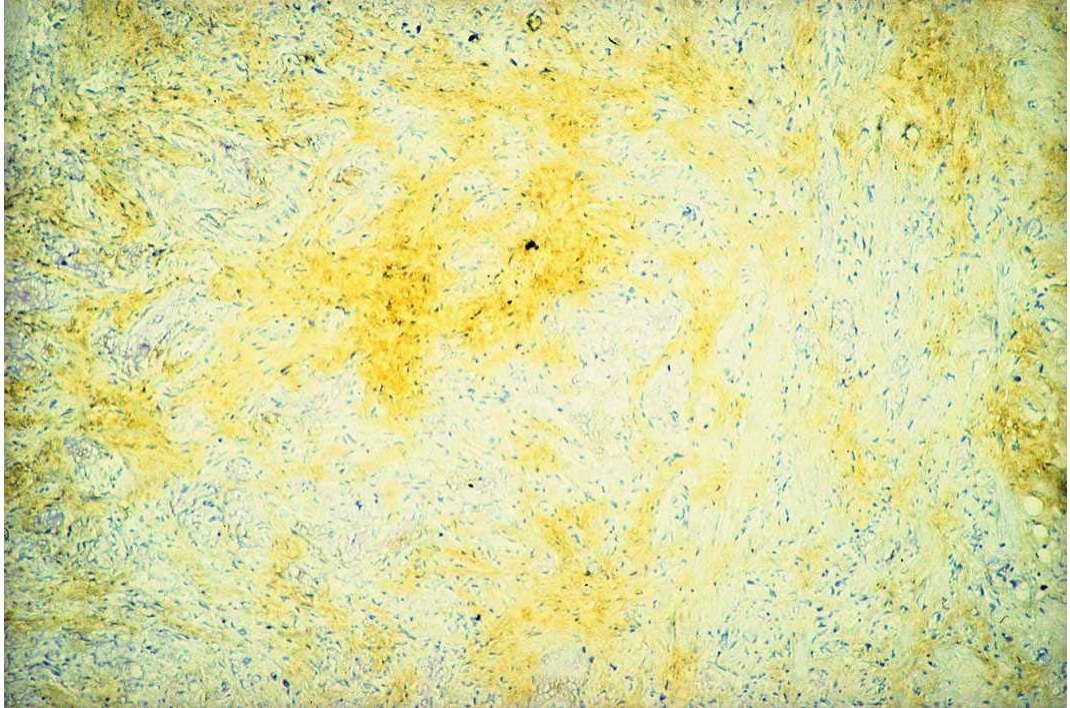


Abbildung 9: HA-Färbung, Pankreaskarzinom, Tumor zentral, Vergrößerung 1:40, 5-23

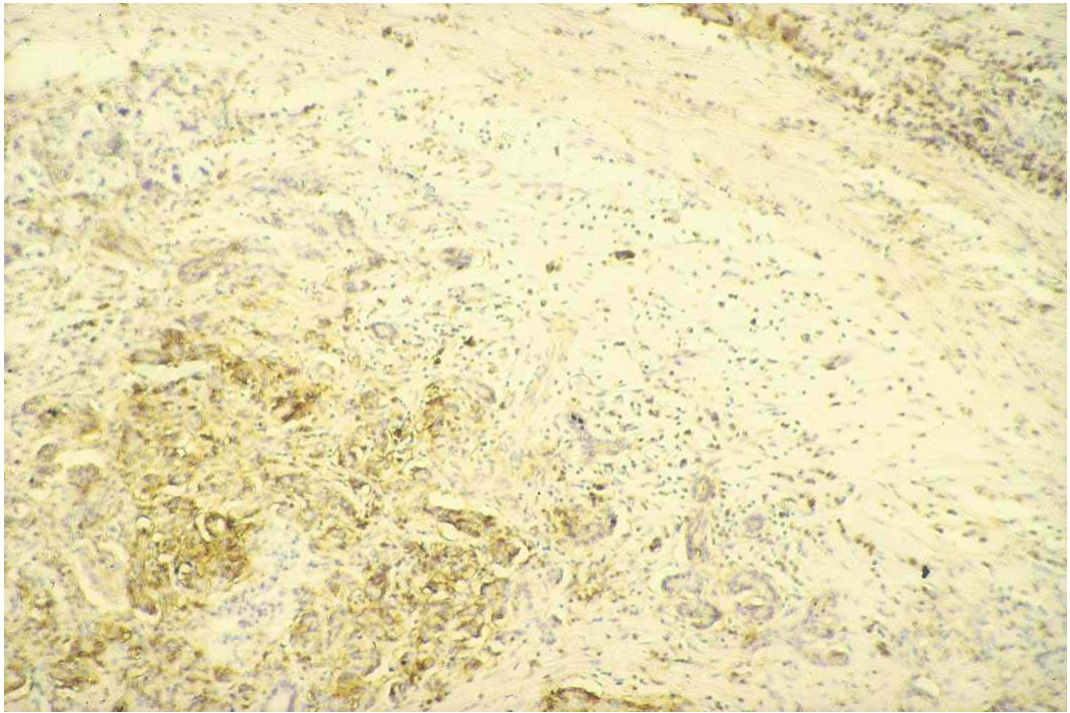


Abbildung 10: CD 44-Färbung, Pankreaskarzinom, Tumorzentrum, Vergrößerung 1:100, 3-16

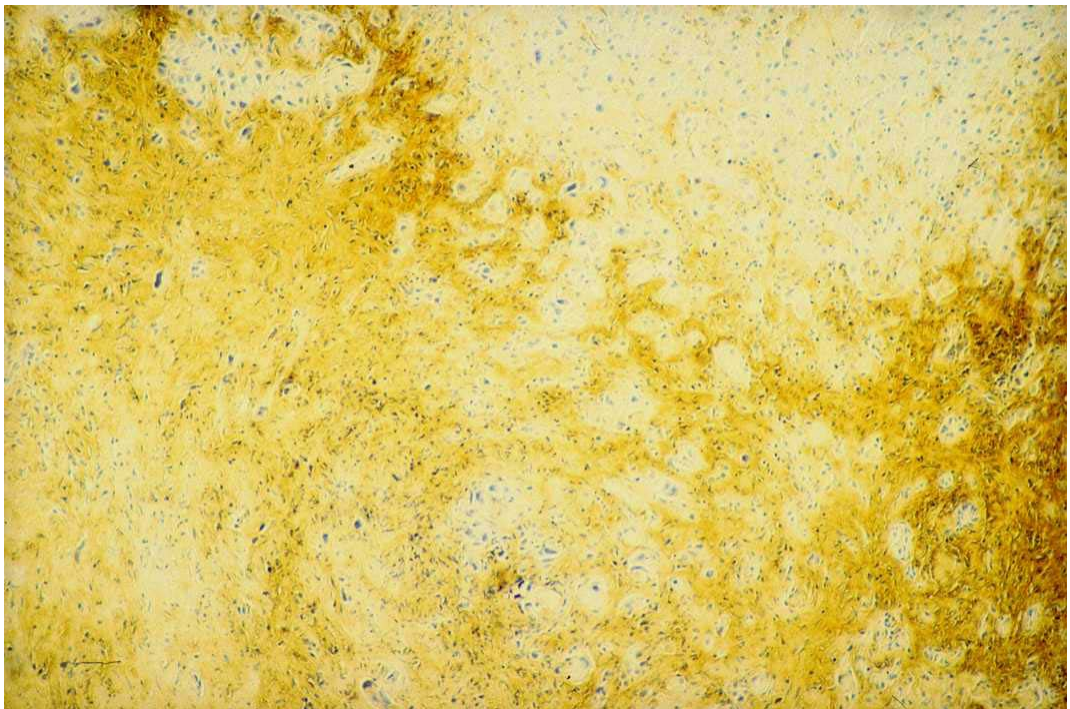


Abbildung 11: HA-Färbung Pankreaskarzinom, Infiltrationsrand einer Lebermetastase, Vergrößerung 1:40, 5-21

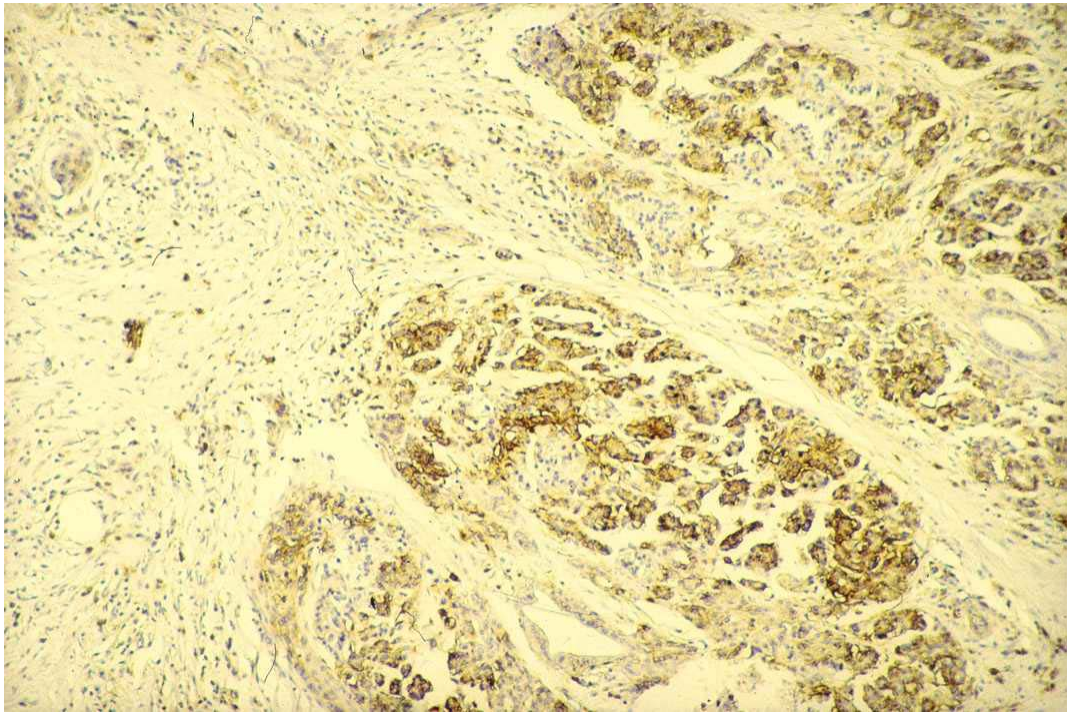


Abbildung 12: CD 44-Färbung, Pankreaskarzinom, Infiltrationsrand, Vergrößerung 1:100, 3-23

D. Diskussion

I. Hyaluronatkonzentration- und Verteilung im Serum

In dieser Arbeit wurden die Hyaluronatkonzentrationen im Serum von Magen- und Pankreaskarzinompatienten, sowie bei einer gesunden Kontrollgruppe bestimmt. Die Werte schwankten stark zwischen 32,74 ng/ml und 222,5 ng/ml bei der Kontrollgruppe und 22,4 ng/ml und 251,0 ng/ml bei Magenkarzinompatienten bzw. 37,04 ng/ml und 207,0 ng/ml bei Pankreaskarzinompatienten. Die Mittelwerte ergaben bei den Pankreaskarzinompatienten eine leichte Erhöhung (104 ng/ml) im Gegensatz zu den Magenkarzinompatienten (88,84 ng/ml) und der gesunden Kontrollgruppe (86,8 ng/ml).

Die Streubreite der gemessenen Werte kann darauf zurückgeführt werden, dass HA im Plasma eine Halbwertszeit von 2,5- 5 min hat (Fraser *et al.*, 1984) und dies bei der Probennahme bzw. dem Test berücksichtigt werden muss. In der Haut und in den Gelenken ist die Halbwertszeit höher. Sie liegt bei ungefähr 12 h, in der Vorderkammer des Auges 1,5 h und im Glaskörper 70 Tage (Laurent und Fraser, 1992).

Da HA mit einfachen Techniken leicht im Blut bestimmt werden kann, kann sie als diagnostischer Marker zahlreicher Krankheiten eingesetzt werden (Engström-Laurent 1987; Engström-Laurent und Laurent, 1989).

Nach abgeschlossener Synthese von Hyaluronat in der Plasmazellmembran und Ausscheidung in den Extrazellulärraum erfolgt die Weitergabe der HA über Lymphbahnen an das Blut, mit anschließendem Transport in die Leber (Laurent *et al.*, 1996). Die HA-Konzentration in der Lymphflüssigkeit ist etwa hundertmal höher als im Blut. Die Halbwertszeit von HA im Plasma beträgt 2,5-5,5 min (Fraser *et al.*, 1983). Leberendothelzellen sorgen für den Abbau von HA. Deshalb haben Leberparenchymerkrankungen einen erhöhten HA-Gehalt im Serum zur Folge.

Da HA in der Leber abgebaut wird, wurden erste Untersuchungen zu HA-Konzentrationen im Serum an Leberkranken gemacht. Bei Patienten mit Leberzirrhose wurden erhöhte Serumlevel (10 bis 100-fach) gefunden. Die Bestimmung von HA im Serum ist sinnvoll, um den Verlauf von Leberkrankheiten zu verfolgen. Der Erfolg einer

Lebertransplantation kann ebenfalls über die Bestimmung von HA verfolgt werden (Adams *et al.*, 1989).

Auch Lindquist, 1997, fand, dass die Bestimmung von Serum-HA zur Kontrolle des Verlaufs bei Lebererkrankungen sinnvoll ist. Bei der biliären Leberzirrhose und der Leberzirrhose allgemein kann mittels Bestimmung des Serum-HA-Gehalts zwischen frühen und fortgeschrittenen Krankheitsstadien unterschieden werden.

Erhöhte HA-Level im Serum wurden auch bei Entzündungsprozessen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Sklerodermatitis beobachtet. Bei der rheumatoiden Arthritis wurde gezeigt, dass die HA-Level im Serum einer diurnalen Veränderung unterliegen. Die höchsten Level wurden am Morgen, nachdem der Patient das Bett verlassen hatte, gemessen. Offensichtlich wird HA über Nacht im Gewebe akkumuliert und am Morgen abgebaut (Engström-Laurent, 1989).

Die diurnale Rhythmik der HA-Konzentration im Serum sollte bei der Probennahme berücksichtigt werden. Die Proben sollten bei allen Patienten etwa zu der gleichen Uhrzeit genommen werden, um diurnale Schwankungen gering zu halten. Um den Abbau von HA in der Probe zu verhindern, sollten die Proben direkt nach der Abnahme aufgearbeitet oder in flüssigem Stickstoff bis zur Aufarbeitung gelagert werden.

Auch in der Literatur findet man häufig starke Schwankungen der einzelnen Messwerte von HA im Serum. Alsalameh *et al.*, 1990, bestimmten die HA-Konzentrationen im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Arthrose und bei einer gesunden Kontrollgruppe. Es zeigten sich signifikant erhöhte HA-Konzentrationen bei Patienten mit Arthritis (204 µg/l). Bei der gesunden Kontrollgruppe (n= 50) wurden im Mittel 37 µg/l mit einer Streubreite von 3-160 µg/l gefunden.

Dahl *et al.*, 1989, beschreiben den Verlauf der HA-Konzentration im Serum und in der Pleuraflüssigkeit von Patienten mit malignem Mesencheliom in verschiedenen Stadien während des Behandlungszeitraums (max. 10 Monate) mit Methotrexat. Es zeigte sich, dass Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien im Vergleich zu Patienten mit dem Stadium 1 anfänglich die höchsten HA-Werte im Serum aufwiesen. Die HA-Konzentration im Serum nahm bei den Patienten, die auf die Behandlung ansprachen, im Verlauf der Behandlung deutlich ab, während die HA-Konzentrationen in der Gruppe mit progressivem Krankheitsverlauf weiter anstiegen.

Vizoso *et al.*, 2004, untersuchten den HA-Gehalt im Zytosol von Magenkarzinomzellen. Sie wollten herausfinden, ob HA als prognostischer Faktor beim Magenkarzinom verwendet werden kann. Es wurden immunenzymatische Techniken eingesetzt. Die zytosolischen HA-Gehalte schwankten in Tumoren wie auch in den Kontrollproben stark (zwischen 50-24523 ng/mg Protein). Die Werte korrelierten allerdings signifikant mit dem Geschlecht der Patienten und einer lymphatischen Invasion. Hohe HA-Gehalte im Tumor korrelierten auch mit einer kürzeren Überlebensdauer.

Erhöhte HA-Mengen finden sich in zahlreichen Tumoren wie Brusttumoren, Eierstocktumor, kolorektalem Karzinom und Lungenkarzinom, also in Tumoren, bei denen dadurch offensichtlich die Invasion erleichtert ist und die Zellmigration vermittelt wird (zusammengefasst von Junker *et al.*, 2002).

Yang *et al.*, 2005, entwickelten einen Test zur Bestimmung des Gehalts von ungesättigten HA-Disacchariden und Chondroitinsulfat mittels Kapillarelektrophorese. Durch diese relativ neue Analysenmethode wird das Methodenspektrum der HA-Bestimmung erweitert. Die Anwendungsmöglichkeiten bei Tumoren müssen noch genauer untersucht werden.

Die Möglichkeit, HA-Bestimmungen bei Magen- und Pankreaskarzinomen als diagnostische oder prognostische Faktoren einzusetzen, wird aufgrund der starken Schwankungen der gemessenen HA-Werte im Blutserum als nicht sinnvoll erachtet.

Trotz der für diese Arbeit unternommenen Anstrengungen einer Standardisierung der Blutabnahmen und Probenverarbeitung war es nicht möglich eine Signifikanz nachzuweisen. Somit ist für eine praktische klinische Anwendung die perspektive nicht gegeben.

Selbst wenn es gelänge in praxi äußere Einflussfaktoren, wie Messmethode, Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik oder Temperatureinflüsse etc., zu standardisieren, würden wohl dennoch endogene Einflussfaktoren (z.B. Arthritis, Leberparenchymerkrankungen, Infekte, etc.), die vielfach bei Patienten noch nicht einmal bekannt sein dürften, die Messwerte zu stark beeinflussen.

Somit erscheint allenfalls eine Kombination der HA-assoziierten Faktoren zum Ausschluß der Variablen und Erhöhung der Spezifität einer solchen Methodik denkbar.

Ekici *et al.*, 2004, untersuchten die Möglichkeit, das Nomogramm für Prostatakarzinompatienten zu erweitern, da bisher nur der klinische Status, der Gleason-Score und das Tumervolumen berücksichtigt wurden. Sie erweiterten die Bestimmungen um vier histologische Marker, HA, Hyal1, CD44-6 und die Mikrogefäßdichte und erhielten, auch zur Prognose von PCA, viel versprechende Ergebnisse.

II. Verteilungsmuster von HA und HA-Fragmenten im Serum

Theocharis *et al.*, 2000, und Theocharis und Theocharis, 2002, untersuchten den Gehalt der verschiedenen Glykosaminglykane (GAG) im Frischgewebe bei Pankreaskarzinompatienten und im Pankreas einer gesunden Kontrollgruppe. Karzinome des Pankreas gehören zu den häufigeren Tumorerkrankungen des Menschen und werden durch eine schlechte Prognose, die höchste Mortalitätsrate und geringe Überlebenszeiten gekennzeichnet. Bei dieser Tumorerkrankung findet frühzeitig eine Invasion in die umgebenden Gewebe statt. Es folgt die Metastasierung der Lymphknoten, Lunge, Bauchfell, Leber und der Knochen. Alle Glykosaminglykane zeigten bei den Karzinompatienten deutlich erhöhte Werte. Besonders HA und Chondroitinsulfat waren deutlich erhöht. Der Gehalt von HA im Pankreas von Karzinompatienten war 12-fach erhöht (388 µg/g Gewebe-Frischgewicht gegenüber 29 µg/g Gewebe-Frischgewicht bei der gesunden Kontrollgruppe). Der Gehalt von Chondroitinsulfat lag sogar um das 22-fache höher als im gesunden Pankreas. Die Chondroitinsulfatkette wiesen gegenüber dem gesunden Gewebe ein geändertes Sulfatisierungsmuster auf. Mittels Anionenaustauschchromatografie wurden drei uronsäurehaltige Fraktionen sowohl in den gesunden wie auch in den Karzinomgeweben gefunden.

Die Elektrophorese dieser drei Fraktionen zeigte, dass sich Hyaluronat in dem ersten Pool und Chondroitinsulfat im zweiten Pool akkumulieren. In der dritten Fraktion befand sich hauptsächlich Dermatansulfat. Theocharis *et al.*, 2002, postulierten, dass

HA beim Pankreaskarzinom an der Ausprägung der Krankheit beteiligt ist, da die meisten festen malignen Tumore erhöhte HA-Raten aufweisen. Der Anstieg des HA-Gehaltes korreliert mit der geringen Differenzierung und der verminderten Überlebensrate bei einigen humanen Karzinomen. Die Akkumulation von HA und Chondroitinsulfat in der extrazellulären Matrix, die den Tumor umgibt, kann für die Wiederherstellung und die Rekonstruktion einer Umgebung verantwortlich sein, die die Proliferation der Zellen und die Invasion über eine GAG-reiche perizelluläre Matrix unterstützt.

Hierbei scheint jedoch das spezifische Verteilungsmuster der HA für das genaue Verständnis dieser Mechanismen von entscheidender Bedeutung zu sein, da bekanntlich entscheidende Unterschiede in der Wirkungsweise von HA über das Molekülgrößenspektrum hinweg bestehen.

Theocharis *et al.*, 2003, untersuchten die Änderungen der Zusammensetzung und Struktur von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen im Magenkarzinom und normalen Magenschleimhäuten als Kontrolle. Im Magenkarzinom wurden zweifach erhöhte Gehalte an Glykosaminoglykanen gefunden. Chondroitinsulfat und HA waren um das dreifache bzw. 2,5-fache im Magenkarzinom erhöht. Dermatansulfat war etwas erhöht, aber der Gehalt an Heparansulfat war gegenüber dem Kontrollgewebe geringer. Auffällig war die Sulfatierungsrate der CS- und DS-Ketten, die zehn- und vierfach erhöht waren.

Der Abbau von HA aus dem Plasma erfolgt größtenteils endozytisch über einen spezifischen Rezeptor in den Leberendothelzellen (Forsberg und Gustafson, 1991). Nach der Endozytose wird HA in Lysosomen transportiert, die Hyaluronidase, β -Glukosidase und β -N-Acetylglucosaminidase enthalten und HA zu Monosacchariden abbauen, die dann ihrerseits weiter metabolisiert werden. Auch in Lymphknoten (Fraser *et al.*, 1988) und den Endothelzellen der Aorta (West und Kumar, 1989) wurden Internalisierung und Degradation von HA beobachtet.

In dieser Arbeit wurden weiterhin die Verteilungsmuster der HA-Fragmente bei Pankreaskarzinompatienten, Magenkarzinompatienten und einer gesunden

Kontrollgruppe mittels Verteilungschromatografie miteinander verglichen. Bei der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich ein hoher schmaler Peak im hochmolekularen Bereich. Im mittleren Konzentrationsbereich schlossen sich vier kleinere Peaks an, deren höchste Konzentration im mittleren Größenbereich angeordnet war.

Dagegen zeigte sich bei den Pankreas- und Magenkarzinompatienten ein anderes Bild: Der Peak im hochmolekularen Bereich war deutlich verbreitert und seine Konzentration im Vergleich zur Gesamt-HA-Menge deutlich reduziert. Dafür erschien die Hyaluronatkonzentration im mittleren und niedrigen Bereich gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht.

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate, die sich häufig bei Tumorpatienten finden: Hochmolekulare HA wird von Hyaluronidasen in kleinere Fragmente gespalten, die ihrerseits einen Beitrag zur Angiogenese und Informationsübertragung leisten.

Große HA-Moleküle sind raumfüllend und verhindern das Kapillarwachstum (West *et al.*, 1985 und 1989), während die kleineren Fragmente (4-20 Disaccharide) die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* stimulieren (West *et al.*, 1989). Diese Fragmente induzieren die Transkription von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und das Erkennen von Verletzungen durch Endothelzellen (Fieber *et al.*, 2004). Oligomere mit 6-20 Da induzieren z. B. die Expression von inflammatorischen Genen in dendritischen Zellen (Termeer *et al.*, 2000 und 2003). Die Tetrasaccharide induzieren die Expression von Hitzchock-Proteinen und sind anti-apoptotisch. Sie unterdrücken den Zelltod.

Simpson *et al.*, 2002, zeigten, dass die Inhibierung der endogenen Hyaluronatsynthese das Tumorwachstum *in vivo* dramatisch reduziert. Toole und Hascall, 2002, fassten diese Ergebnisse zusammen und beschreiben u.a. die Rolle von HA bei der Angiogenese. Die Angiogenese wird durch Gabe von HA-Oligosacchariden gefördert, durch die Gabe von hochmolekularem HA aber inhibiert. Die Inhibierung der HA-Synthese reduziert die Tumervaskularisierung stark. Eine Co-Injektion von exogenen hoch molekularen HA stellt die Dichte der Blutgefäße bis auf das Niveau der Kontrolle wieder her (Itano *et al.*, 1999). HA-Synthasen produzieren hochmolekulares HA. Hyaluronat selbst, die Hyaluronidase-Gehalte und der HA-Abbau stimulieren die Tumorangiogenese und korrelieren mit der Tumorprogression. Durch den Hyaluronidase-vermittelten Abbau von Tumor-Hyaluronat werden hohe

Konzentrationen von HA-Oligosacchariden gebildet, die die Tumorangiotenese und das Tumorstachstum stimulieren.

Es gibt aber auch Untersuchungen, die zeigen, dass HA-Oligomere das Tumorstachstum *in vivo* hemmen, so dass die Rolle von HA, Hyaluronidasen und HA-Synthasen immer noch weiterer Aufklärung bedürfen.

Genau diese widersprüchliche Interpretationsmöglichkeit folgt auch aus den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchung der Molekülgrößen. Offensichtlich ist der Regulationsmechanismus des Tumorstachstums also deutlich komplizierter und stärker multifaktoriell bedingt, als es die genannten Erklärungsmodelle glaubhaft machen wollen.

Ansätze hierzu liefern z.B. Adamia *et al.*, 2005, die die Wirkung der verschiedenen HA-Formen und -Synthasen (HAS) beschreiben. Intrazelluläre HA spielt eine Rolle bei der Zellsignalvermittlung, während nukleäre HA die Chromatinkondensation fördert und so die Mitose ermöglicht. HA wird von drei HA-Synthasen gebildet. Wenn die HA-Synthese auf genetischer Ebene gestört wird, werden abnormale Mengen HA gebildet, die zu Transformation und Metastasierung beitragen. Die Funktion der HAS scheint Zell- und gewebespezifisch zu sein. HAS1 erhält eine geringe, basale HA-Konzentration aufrecht. HAS2 ist an der embryonalen und kardialen Cushion-Morphogenese, und einer anschließenden Entwicklung zur Zellmigration und Invasion beteiligt. HAS2 stimuliert die Zellproliferation und die Angiotenese. HAS3 scheint die malignen Phänotypen in vielen verschiedenen Krankheitstypen zu fördern.

Diese Ergebnisse führten dazu, dass versucht wird, die Hyaluronatsynthese oder die Hyaluronidasen zu hemmen und diese Hemmung in der Tumorthherapie einzusetzen.

III. Inhibierung der Hyaluronidasen

Über die Inhibitoren von Hyaluronidasen ist wenig bekannt. Sie sind aber in praktisch jedem Gewebe in Mengen, die den Gehalt an Enzymen, die gehemmt werden sollen, weit übersteigt, vorhanden.

Der am häufigsten gefundene Inhibitor der Hyaluronidasen im Serum ist Magnesium-abhängig und wird durch Proteasen, Chondroitin-Verdau und Hitze eliminiert. Der

Inhibitor übt keinen Effekt auf die Streptomyces-Hyaluronidase, aber auf Hyaluronidasen aus Bienen, Hoden oder Schlangen aus. Dies bedeutet, dass die Inhibierung nicht durch das (HA)-Substrat blockiert wird. Der Inhibitor wurde in der HA-reichen Kumulus-Masse von Säuger-Ova und in der perizellulären Bedeckung der Fibroblasten und Mesothelzellen gefunden und könnte die Matrices mittels Schutz gegen Abbau durch Hyaluronidasen stabilisieren. Der Abbau von HA im Serum geht mit einer Halbwertszeit von 2,5-5 min sehr schnell (Mio und Stern, 2002).

Ein anderer Hyaluronidaseinhibitor wird bei Krebs-Patienten im Serum gefunden und ist nicht Magnesium-abhängig und unterscheidet sich von der häufigeren Variante auch qualitativ (Fischer-Szafarz, 1968).

Ein schneller und starker Anstieg von zirkulierender HA findet bei Schock, Sepsis (Berg *et al.*, 1988; Berg, 1997), Verwundung, starken Verbrennungen und starkem Blutverlust (Onarheim *et al.*, 1991, Ferrarra *et al.*, 1991) statt. HA und ihre hydrierte Form sind natürliche „emergency-Moleküle“, die auf Stress antworten. Sie stellen einen intravaskulären Volumenexpander dar, der den zirkulatorischen Kollaps verzögert oder verhindert.

Eine Erklärung für den starken HA-Umsatz kann der schnelle Anstieg der HA-Gehalte als Antwort auf Stress sein. Viele biologische Systeme werden negativ kontrolliert. Eine Stimulation der Synthese wird normalerweise nicht stattfinden, wenn eine schnelle Reaktion nötig ist, sondern durch die Freisetzung der Negativ-Kontrolle angeregt werden. Inhibitoren der Hyaluronidasen können zum schnellen Anstieg der HA-Gehalte beitragen, da diese Inhibitoren „acute-phase-proteins“ sind, die in der Leber synthetisiert werden und als Antwort bei Stress, IL-1 und anderen Induktoren der „acute-phase-response“ freigesetzt werden (Mio *et al.*, 2000; Mio und Stern, 2002).

HA-Ketten können nicht nur durch Hyaluronidasen, sondern auch durch freie Sauerstoffradikale, besonders in der Gegenwart von Ascorbinsäure oder bestimmten divalenten Kationen (Myint *et al.*, 1987; Uchiyama *et al.*, 1990) gespalten werden. Freie Radikale werden in den frühen Stadien der Wundheilung, zusammen mit dem „oxidative burst“ der polymorphonukleären Leukozyten-Myeloperoxidasen gebildet (Moseley *et al.*, 1997).

Zellkulturen sekretieren Hyaluronidasen aus den Zellen in das Kulturmedium. Dies geschieht nicht *in situ*. Die ungehinderte Hyaluronidase-Produktion würde im Gewebe große Schäden anrichten. Die gleichzeitige Deponierung von Hyaluronidasen und ihren Inhibitoren lässt sich so erklären, dass eine parallele Kontrolle durch Matrix-Metalloproteasen durch die Gewebeinhibitoren der MMPs ermöglicht wird (Visse und Nagasse, 2003).

Hyaluronidasen und große HA-Mengen werden gemeinsam in Tumoren gefunden. Die Hyaluronidasen kontrollieren die Balance zwischen hochmolekularer HA und Oligosacchariden, die eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielen.

Asteriou *et al.*, 2005, untersuchten die HA-Hydrolyse durch Hyaluronidasen in einem Modell mit einer bovinen testikulären Hyaluronidase. Sie fanden ein untypisches Verhalten dieses Enzyms bei geringen Ionenkonzentrationen. Bei steigenden HA-Konzentrationen stieg die anfängliche Reaktionsrate, erreichte ein Maximum und fiel bei hohen Substratkonzentrationen auf ein sehr niedriges Level ab. Sie postulierten unspezifische Komplexe zwischen HA und der Hyaluronidase, die auf elektrostatischen Interaktionen basieren.

Hyaluronidasen bauen nicht nur HA ab, sondern sind an der Ausbreitung von Infektionen, Toxinen, der Ovum-Fertilisation und der Tumorprogression beteiligt. Deshalb können Hyaluronidase-Inhibitoren bei der Behandlung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielen. Isoyama *et al.*, 2006, untersuchten die Wirkung von 21 Inhibitoren auf verschiedene (testikuläre, von Honigbiene oder Streptomyces stammende) Hyal-1. Von den Inhibitoren erwiesen sich die Polymere (Styrol-4-Sulfonat) und die O-sulfatierte HA als am effektivsten. Bienen-Hyaluronidasen waren am sensitivsten. Streptomyces-Hyaluronidase war gegen alle Inhibitoren, außer Polystyrol 990000, resistent. Die Länge der Polystyrol-Kette bestimmte ihr Wirkungspotential. Weitere bekannte Hyaluronidase-Inhibitoren wie Gossypol, Natrium-Aurothiomalat, 1-Tetradecan-Sulfonsäure und Glycerinsäure waren nicht wirksam. Die Hyaluronidase-Inhibitoren zeigen sowohl Selektivität als auch unterschiedliche Wirkungsgrade gegen die verschiedenen Hyaluronidasen.

Stern, 2004, postuliert ein eigenes neues Mini-Organell für den HA-Metabolismus, das Hyaluronasom. Grundlage dieser These sind Parallelen im Abbau von Glykogen und Hyaluronat. Ein Glykogen-Mini-Organell kommt sowohl in der Leber als auch im Muskelgewebe vor. Das Hyaluronasom könnte den Glykogen-Granula gleichen, jedes in den Metabolismus der großen Kohlenhydrat-Ketten involviert, wobei Glykogen ein verzweigtes Kettenpolymer mit α -gebundenen Zuckern und HA ein gerades Ketten-Polymer mit β -gebundenen Zuckern ist. Mian, 1986a,b, postulierte einen Multi-Protein-Membran-assoziierten Komplex, der HA synthetisiert, aber auch katabolische Aktivität aufweist. Dieser Komplex könnte Teil des Hyaluronasoms sein, also eine Funktionseinheit, die Responsemechanismen bereitstellt, die vom metabolischen Status der Zelle abhängig sind.

Stern, 2004, begründet die Existenz des Hyaluronasoms durch eine sinnvolle Zuordnung der folgenden Ergebnisse: Zellkulturen, die mit geringen Hyaluronidase-Konzentrationen behandelt werden, erhöhen das Niveau der HA-Synthese (Philipson *et al.*, 1985; Philipson und Schwartz, 1984; Larnier *et al.*, 1989). Die Behandlung von Membranpräparationen mit geringen Hyaluronidase-Konzentrationen hat einen ähnlichen Effekt (Philipson und Schwartz, 1984). Dies ist vergleichbar mit einem Feedback-Mechanismus, der es den Zellen ermöglicht, die HA-Gehalte wahrzunehmen, die synthetisiert wurden. Exogen verabreichte Hyaluronidasen spalten die neu synthetisierten HA-Ketten, sobald sie durch die Plasmamembran geschleust werden und informieren so die Zelle, dass inadäquate Mengen an HA synthetisiert wurden (Prehm, 1984). Das Hyaluronasom, das unterhalb und teilweise in der Plasmamembran eingebettet vorliegt, könnte auf einen Servomechanismus, der einen Rezeptor wie CD44 benutzt, angewiesen sein, um die Feedback-Meldungen weiterzuleiten. Größere Hyaluronidasemengen modulieren das Profil der Expression der CD44-Varianten (Tanabe *et al.*, 1993; Stern *et al.*, 2001). So werden die hochgradigen Kontrollen, die für solch einen regulatorischen Mechanismus nötig sind, bereitgestellt.

HA-Mengen, die in den Zellen deponiert werden, müssen auf verschiedene physiologische Stadien wie Wachstumsphasen (Tomida *et al.*, 1974), Mitose und Zellablösung vom Substrat, Anoxie und Laktat, virale Transformation und Serum-Stimulation reagieren.

Damit das Hyaluronasom sowohl auf extrazelluläre Ereignisse wie auch auf intrazelluläre metabolische Stadien der Zelle antworten kann, enthält es HA-Rezeptoren wie CD44 und RHAMM, HA-Synthase-Enzyme, Hyaluronidasen, Hyaluronidase-Inhibitoren, β -Exoglykosidasen und HA-bindende Proteine wie HABPI.

Die genannten Regulationsmechanismen bieten somit in vitro vielversprechende Ansatzpunkte, deren in vivo-Anwendbarkeit zur Hemmung des Tumorwachstums in der Zukunft zu überprüfen sein wird.

IV. Histochemische Untersuchungen von HA und CD44 in Tumoren bei Pankreaskarzinomen und Magenkarzinomen

In dieser Arbeit wurden HA und CD44 immunhistochemisch in Präparaten von Pankreaskarzinomen angefärbt. Für HA und CD44 ergab sich folgendes Bild:

Im gesunden Organparenchym wurde wenig bis gar kein HA oder CD44 nachgewiesen. Das Bindegewebsstroma wies eine leichte bis mittelgradige Färbung auf. Im Zentrum des Tumors war HA nur in geringen Mengen zu finden, während im Stroma im Vergleich zum gesunden Gewebe eine deutlich intensivere Färbung nachgewiesen wurde. Für CD44 zeigte sich ein ähnliches Bild. Am Infiltrationsrand des Tumors zeigte sich am deutlichsten, dass CD44 und HA eher im Stroma als in den soliden Tumorteilen vorkommen.

Diese Ergebnisse decken sich mit den bisherigen Untersuchungen zur Lokalisation von HA und CD44. HA findet sich eher im Stroma als im Parenchym von Tumoren (Toole *et al.*, 1979).

Die Hyaluronatproduktion der Stromazellen wird durch Interaktion mit Tumorzellen stimuliert. Bei Tumorpatienten sind die HA-Konzentrationen generell höher in malignen Tumoren als in benignen oder normalen Gewebe und in einigen Typen ist HA prädiktiv für die Malignität.

Bei Patienten mit Brustkrebs oder Eierstockkrebs ist der hohe HA-Gehalt im Stroma mit einer geringen Überlebensrate verbunden. Der Gehalt an parenchymalen HA korreliert mit der Malignität bei Patienten mit gastrischen und kolorektalen Tumoren. HA und

ihre Rezeptoren sind mit den zirkulierenden Krebszellen assoziiert (zusammengefasst von Toole, 2004).

In Magenkarzinomen wurden mittels immunzytochemischen Analysen und Western-Blot-Hybridisierung die verschiedenen Isoformen von CD44 und RHAMM bestimmt (Li *et al.*, 2000). Es wurde die Isoform CD44v6 gefunden, die mit der malignen Transformation des gastrischen Epitheliums in Verbindung gebracht wird.

Auch Setälä *et al.*, 1999, untersuchten die Verteilung von HA in Magenkarzinomzellen. Sie verwendeten einen Test mit biotinylierten Antikörpern. HA-Färbung wurde bei 93 % der Tumore im Parenchym gefunden, während das Stroma innerhalb und um den Tumor herum in jedem Fall gefärbt war. Eine starke Färbung wurde bei starker Tumordinvasion (pT3 oder 4) gefunden.

Die Standard CD44-Form (CD44v), die CD44-Isoform v5 (CD44v5), die CD44v6-Variante, das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) werden in humanen malignen Zellen exprimiert. Der Mechanismus ist nach wie vor unklar, aber sie sind an der Progression und Metastasierung von bösartigen Tumoren beteiligt.

Kawano *et al.*, 2005, untersuchten die Korrelation zwischen den CD44-Isoformen, ICAM-1 und VCAM-1 und den klinischen Variablen (Alter, Geschlecht, Grading, Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Metastasierung und TNM-Staging) bei 81 Patienten mit Kopf- und Halskrebs. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen den Serum-Werten der CD44-Isoformen, ICAM-1, VCAM-1 und den klinischen Parametern. Der erhöhte Serum-Gehalt der CD44v6-Isoform korrelierte allerdings mit der Metastasierung.

V. Spaltung von CD44 und CD44-Verteilung in Tumorzellen

Sugahara *et al.*, 2005, fanden kürzlich, dass Tumorzellen durch die Bildung kleinerer HA-Fragmente selbst für die Spaltung von CD44 und Motilität sorgen. Sie stellten fest, dass HA mit geringem Molekulargewicht die proteolytische Spaltung von CD44 an der Oberfläche der Tumorzellen induziert und die Tumorzellenmigration in einer CD44-

abhängigen Art und Weise fördert. In einer Pankreaskarzinomzelllinie werden reichlich Hyaluronidasen sekretiert und messbare HA-Gehalte mit geringem Molekulargewicht von 10-40 Einheiten gebildet. Dies geschieht in Abwesenheit einer exogenen Stimulation. Die HA-Oligosaccharide, die vom Tumor stammen, konnten sowohl die Spaltung von CD44 als auch die Tumorzellen-Motilität fördern. Die Inhibierung der CD44-HA-Interaktion führte zur vollständigen Unterbrechung dieser zellulären Ereignisse. Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass Tumorzellen selbst durch die Expression ihrer eigenen konstitutiven Hyaluronidasen HA-Oligosaccharide bilden, die an Tumorzellen-CD44 binden. Dies begünstigt die eigene Spaltung von CD44 und die Zellmotilität, was folglich die Tumorprogression fördert.

Diese in vitro-Ergebnisse korrelieren gut mit den, in den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit gefundenen, Verteilungen von HA und CD44 im Infiltrationsbereich der untersuchten Tumoren. Warum jedoch HA und CD44 in den soliden Tumorstromaregionen hier kaum nachgewiesen werden konnten bleibt noch zu klären.

Der Serum-Gehalt von CD44, der durch die Spaltung von CD44 entsteht, korreliert mit der Tumorerkrankung. Verstärkte CD44-Spaltung wurde in invasiven Tumoren wie Brustkrebs, Hirntumoren, Lungenkarzinom, Kolonkarzinom und Ovarialkarzinom beobachtet. Stimuli der „Up-Regulation“ der CD44-Spaltung wie Phorbol ester und HA-Oligosaccharide fördern die Tumorzellmigration. Deshalb wurde die Spaltung von CD44 mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht. Die Induktion der CD44-Spaltung durch Tumorzellprodukte wie HA-Oligosaccharide stattet die Tumorzellen mit einem weiteren wichtigen Vorteil bei der Invasion und Metastasierung aus (zusammengefasst von Sughara *et al.*, 2005).

VI. Ansätze zur Tumorthherapie

Aufgrund der neueren Erkenntnisse in der Tumorbilogie gibt es zahlreiche Ansätze neue Wirkstoffe gegen Tumorzellen zu entwickeln. Einerseits werden immer weitere tumorhemmende Stoffe gefunden (z.B. Caffeoylesterivate). Rousseau *et al.*, 2005,

untersuchten die Wirkung von Echinacosid, einem Caffeoyle-Konjugat aus Echinacea, das die Hyaluronidase hemmt, bei der Wundheilung und fanden gute Effekte.

Zum anderen wird nach „sanfteren“ Möglichkeiten bei der Therapie gesucht. Dazu gibt es Ansätze, HA als Transportstoff für Therapeutika einzusetzen. Diese Ansätze werden im Folgenden beschrieben und diskutiert.

Peer und Margalit, 2004, untersuchten die Wirkung von Tumor-gezielten Hyaluronan-Liposomen auf die Antitumoraktivität im syngenetischen und humanen xenograft Maus-Tumormodell. Natürlich vorkommendes HA wird an die Oberfläche von Nanoliposomen gebunden und ist so ein Kandidat zum „aktiven Zielen“ auf Tumore, die HA-Rezeptoren wie CD44 und RHAMM überexprimieren. Das an die Oberfläche gebundene HA stellt auch einen hydrophilen Überzug dar, der ähnlich wie Polyethylenglykol die langfristige Zirkulation fördern kann. Es wurde bereits Mitomycin C erfolgreich in tumortragende syngenetische Mäuse durch HA-Liposomen eingebracht.

Peer und Margalit, 2004, beschreiben das Einbringen von Doxorubicin (DXR) in die HA-Liposomen in ein syngenetisches xenograft Modell. Die beladenen Liposomen zirkulierten länger als die Kontrollen, sowohl in den tumortragenden als auch den gesunden Kontrollmäusen. Die gemessene mittlere DXR-Akkumulation war höher als freies gegebenes DXR. Anschließend wurden die klinischen Parameter wie Tumorprogression, Metastasierung und die Überlebensrate bestimmt. Diese HA-Liposomen haben das Potential, als auf den Tumor gerichtete Carrier bei der Antitumor-Therapie zu wirken.

Hyaluronan kann intravenös in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt werden, da sich gezeigt hat, dass systemisch appliziertes HA die Behandlungstoxizität verbessert. Rosenthal *et al.*, 2005, führten eine Studie an 30 Patienten mit metastatischen Tumorerkrankungen durch, um zu prüfen, ob HA in Kombination mit 5-Fluorouracil und Doxorubicin (DOX) gegeben werden kann. Auch hohe Dosen von intravenösem hochmolekularem HA wurden gut vertragen und können sicher mit Chemotherapeutika gegeben werden.

Auch verschiedene andere Stoffe wurden gefunden, die z.B. die Metastasierung hemmen und in den HA-Stoffwechsel eingreifen. Ein Beispiel ist 4-Methylumbelliferon, das ein Suppressor der HA-Synthase ist.

Yoshihara *et al.*, 2005, berichten über die Suppression der Metastasierung und eine geringere HA-Bildung an der Zelloberfläche in Melanomzellen. Methylumbelliferon hat das Potenzial, als anti-metastatisches Agens zu wirken. Die Kombination von 4-Methylumbelliferon mit Gemcitabin *in vivo* an transgenen Mäusen mit einer kombinierten schweren Immundefizienz-Krankheit und Tumoren senkte die Größe der primären und metastatischen Tumore mehr als die Gabe von Gemcitabin allein. So kann eine Kombination von 4-Methylumbelliferon mit Gemcitabin wirksam gegen humane Pankreastumorzellen sein. Methylumbelliferon hat das Potential als ein Chemosensibilisator zu wirken. Auf diese Weise können damit neue Antikrebs-Strategien entwickelt werden (Nakazawa *et al.*, 2006).

Coradini *et al.*, 2004, zeigten, dass HA-Buttersäureester bei Murinen-Lewis-Lungen-Karzinomzellen die Bildung von Lungenmetastasen reduziert.

Speranza *et al.*, 2005, bestätigten diese Ergebnisse in ihrer Untersuchung eines Histon-Deacetylase-Inhibitors (HDAC), dem Hyaluronsäurebuttersäureester (HA-But). Der kleinste HDAC-Inhibitor ist die Buttersäure (BA). HA-But war zehnmal so effektiv wie BA und inhibierte die Proliferation verschiedener humaner Krebszelllinien. Ähnlich wie BA regulierte er die Expression einiger Proteine des Zellzyklus, um so einen Wachstumsstopp in der G1/G0-Phase des Zellzyklus zu induzieren und die Histonacetylierung zu erhöhen. *In vivo* hemmte HA-But das Tumorstadium und die Bildung von Lungenmetastasen bei Murin-Lewis-Lungenkarzinom-(LL3)-Zellen. Es wurde auch die Bildung von Lebermetastasen in B16-F10-Murin-Melanomzellen inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das HA-Gerüst nicht in die biologische Aktivität von Buttersäureresten eingreift und das HA-But eine geeignete Substanz zur Behandlung von primären und metastatischen Tumoren sein kann.

Auvinen *et al.*, 2005, untersuchten immunhistochemisch die Expression verschiedener CD44-Isoformen in benignen und malignen Brustkrebsläsionen. CD44s, aber nicht CD44v3 oder CD44v6 wurde in den Stromazellen gefunden. Die Verteilung von CD44s

war sowohl in malignen wie auch benignen Geweben ähnlich. In benignen Läsionen wurde CD44v6 in 20-30 % der dukталen Epithelzellen gefunden, während CD44v3 und CD44s nicht exprimiert wurden. CD44s, CD44v3 und CD44v6 wurden in *in situ* Karzinomen und invasiven Karzinomen hochreguliert. Der Gehalt der CD44-Expression in Karzinomzellen korrelierte nicht mit dem Typ oder der Differenzierung der Tumore. Die CD44 und HA-Expression waren nicht eng mit den benignen oder malignen Brustkrebsläsionen verbunden, da HA bei der Brustkrebsprogression später exprimiert wird als CD44. CD44s, CD4v3 und CD44v6 werden früher als HA bei der Brustkrebsprogression hochreguliert und co-lokalisieren in späteren Stadien oft mit dem HA an der Zelloberfläche.

Da HA und CD44 mit der Tumordinvasion und Metastasierung eng assoziiert sind, untersuchten Xing *et al.*, 1998, immunhistochemisch, ob bei unterschiedlichen Aggressivitätsgraden verschiedene Gehalte und Muster von HA und CD44 im Speicheldrüsentumor exprimiert werden. Monomorphe Adenomtumorzellen waren sowohl für HA als auch für CD44 negativ. Die Tumorkapseln waren stark HA-positiv. Pleomorphe Adenome waren sowohl im Mesenchym als auch in den Epithelyen HA und CD44 positiv. HA wurde auch im Kapselgewebe nachgewiesen. Die Tumorzellen der meisten adenoiden zystischen Karzinome waren HA-positiv, während die meisten polymorphen Adenokarzinome geringen Grades HA-negativ waren. HA wurde in allen Stromageweben von hoch- und niedriggradigen Erkrankungen verteilt. Nur im polymorphen Adenokarzinom geringen Grades wurde HA intensiv am Invasionsaum des Tumors gefunden. Die CD44-Expression wurde in Tumorzellen, aber nicht im Stroma beobachtet und war in beiden, geringen und hochgradigen Tumoren, intensiv.

VII. Neue Ansätze der Tumorthherapie

Um gezielt tumor-spezifische Medikamente herzustellen, ist es nötig, die morphologischen und physiologischen Besonderheiten von Tumoren gegenüber gesunden Zellen zu betrachten. Schnell wachsende Tumorzellen sind auf die schnelle Bildung neuer Blutgefäße angewiesen. Die Tumervaskulatur hat zahlreiche Defekte, die

es großen Molekülen und Lipiden erleichtert, den extravaskulären Raum in Tumoren zu erreichen. Auf der anderen Seite ist das lymphatische System in Tumoren unterentwickelt, so dass große Moleküle und Lipide vom Tumor nicht freigesetzt werden können.

Das physiologisch auffälligste Merkmal von Tumoren ist ihre erhöhte Stoffwechselrate, die Hypoxität hervorruft. Dies führt zu anaerobem Stoffwechsel, der zur Bildung von Laktat führt, und so den pH-Wert intrazellulär senkt. Ein schnell wachsender Tumor benötigt verschiedene Nährstoffe und Vitamine. Deshalb exprimieren Tumorzellen verstärkt tumorspezifische Rezeptoren, die ihrerseits als Ziele genutzt werden können, um zytotoxische Agenzien in den Tumor einzuschleusen.

Die traditionelle Chemotherapie gegen Krebs geht davon aus, dass die proliferierenden Krebszellen wahrscheinlich am effektivsten durch zytotoxische Agenzien abgetötet werden können. In der Realität haben Zytostatika aber keine oder nur eine geringe Spezifität, was zu systemischer Toxizität führt, die eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen auslösen. Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten Systeme untersucht, die zu schonenderen Medikamenten führen. Tumorzellen exprimieren zahlreiche Rezeptoren und Biomarker, die als Ziele zur Entwicklung zytotoxischer Agenzien benutzt werden können. Ein System, das zytotoxische Agenzien in den Tumor bringen soll, besteht ganz allgemein aus einem Tumorerkennungsteil und einem zytotoxischen „Sprengkopf“, der direkt oder durch eine geeignete Verbindung ein Konjugat formt. Das Konjugat sollte systemisch untoxisch sein. Dies bedeutet, dass die Verbindung bei der Zirkulation stabil sein muss. Wird die Verbindung in die Tumorzelle internalisiert, sollte das Konjugat leicht abgespalten werden können, um ein zytotoxisches Agens zu aktivieren. Auf Tumore abgezielte Konjugate, die zytotoxische Agenzien beinhalten, können in verschiedene Gruppen, basierend auf den Typ der Krebs-Erkennungsreste, eingeteilt werden. Mögliche Konjugate sind monoklonale Antikörper, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Folsäure, HA und Oligopeptide (zusammengefasst von Jaracz *et al.*, 2005).

Das Fortschreiten vieler Tumorerkrankungen korreliert mit der Synthese des Glykosaminglykans Hyaluronan. HA wird in der Plasmamembran von verschiedenen

Isoformen der HA-Synthase (HAS) synthetisiert. Mittels antisense-Inhibierung von HAS2 (ASHAS2) wurde der Einfluss der HAS2-Expression in stark invasivem Brustkrebs gezeigt. Der Effekt der HAS2-Inhibierung auf die Zellproliferation, Migration, dem HA-Metabolismus und dem Rezeptor-Status wurde von Udabage *et al.*, 2005, *in vitro* untersucht, wobei der Einfluss auf die Tumorgenität und Metastasierung *in vivo* untersucht wurde. Die Inhibierung von HAS2 führte zu einer 24-stündigen Verzögerung der Proliferation, die von einem kurzfristigen Verbleiben von 79 % der Zellen im G0-G1-Stadium begleitet war. Die Inhibierung der HAS-2 führte nicht zu einer geänderten Expression der anderen HAS-Isoformen, während die Hyaluronidase2 und der HA-Rezeptor CD44 signifikant „down“ reguliert wurden. ASHAS-2-Zellen akkumulierten größere Mengen hoch-molekularen HAs (> 10000Da) im Kulturmedium, während Mock- und Parentalzellen weniger HA mit drei bestimmten Molmassen (100, 400 und 3000 Da) freisetzten. Die Inhibierung von HAS2 in einer hoch invasiven Brustkrebszelllinie unterdrückte den Beginn und die Progression der primären und sekundären Tumorbildung. Das Fehlen der primären und sekundären Tumorbildung führte zu 172fach längeren Überlebensraten der ASAH2-Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen. Diese Untersuchungen zeigen die zentrale Rolle der HAS2 bei Beginn und Progression von Brustkrebs, sowie die Co-Abhängigkeit zwischen HAS2, CD44 und der HYA12-Expression.

Okorukwu und Vercruysse, 2003, untersuchten die Inhibierung testikulärer Hyaluronidasen und Hyaluronatlyasen durch L-Ascorbinsäure und deren chemische Analoga. Sowohl L-Ascorbinsäure als auch D-Isoascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure inhibierten beide Enzyme, zeigten aber stärkere Effekte bei der Hyaluronatlyase. Die beiden Komponenten waren in der Lage, selbst das Substrat HA abzubauen.

Saccharinsäure inhibierte die Hyaluronatlyase, während sie auf die testikuläre Hyaluronidase keine Effekte ausübte. Dieses ist der erste Stoff, der gefunden wurde und eine selektive Inhibierung der Hyaluronatlyase aufweist.

VIII. Hemmung von CD44

CD44 ist ein multistrukturelles und multifunktionelles Zelloberflächenmolekül, das an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, Angiogenese, Bildung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren für die entsprechenden Rezeptoren, dem Ankoppeln von Proteasen an die Zellmembran wie auch den Signalen zum Überleben der Zelle beteiligt ist. Alle diese biologischen Eigenschaften sind essentiell für die physiologischen Aktivitäten von normalen Zellen, aber sie sind auch mit den pathologischen Aktivitäten von Tumorzellen assoziiert. Tierexperimente zeigten, dass CD44 als Ziel für Antikörper, antisense und CD44-lösliche Proteine die malignen Aktivitäten in verschiedenen Neoplasmen deutlich reduziert, so dass anti-CD44-Agenzien für therapeutische Zwecke genutzt werden könnten. Da CD44 durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen viele verschiedene CD44-Sequenzen bildet, kann die Produktion von anti-CD44 tumor-spezifischen Agenzien ein realer therapeutischer Ansatz sein. In einigen Tumoren (Nierenkrebs und Non-Hodgkin-Lymphom sind Ausnahmen) sind aber hohe Gehalte der CD44-Expression nicht immer mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Allerdings ist noch weitere Forschung nötig, um anti-CD44 geeignete Medikamente zu entwickeln, da häufig widersprüchliche Ergebnisse bei gleichen Forschungsansätzen gefunden werden (zusammengefasst von Naor *et al.*, 2002).

Ein weiterer Therapieansatz mit CD44, bei dem geeignete Therapien gegen die Tumorprogression und -bildung gefunden werden sollen, ist die Hemmung des Hyaluronat-Rezeptors CD44.

Hibino *et al.*, 2005, entdeckten ein Peptid (Laminin alpha5 A5g27), das an den CD44-Rezeptor von Melanomzellen über die Glykosaminglykane am CD44-Molekül bindet und die Tumorzellenmigration, Invasion und die Angiogenese in einer dominanten-negativen Art inhibiert. In WiDr-humanen-kolorektalen-Karzinomzellen band das Laminin A5G27-Peptid an die Heparin-ähnlichen und Chondroitinsulfat-B-Glykosaminglykan-Seitenketten von CD44. Durch das Laminin A5G27-Peptid wurde die Zellbindung an den Fibroblast-Growth-Factor (FGF) blockiert, aber weder gemixtes Laminin A5G27-Peptid oder ein anderes Lamininpeptid, das Zelloberflächen

Proteoglykane bindet, zeigten diesen Effekt. Das Laminin A5G27-Peptid blockierte auch die von FGF2 ausgelöste Signalkaskade, an der die Tyrosinphosphorylierung beteiligt ist. Das Laminin A5G27-Peptid blockiert direkt die Bindung von FGF2 an Heparin. Es hat eine Sequenzhomologie zu einer Region von FGF2, die Heparin und FGF2 bindet und für die Bildung der FGF2-zentralen Höhle zuständig ist. Es wird angenommen, dass das Laminin A5G27-Peptid die Metastasierung und die Angiogenese hemmt, indem die FGF2-Bindung an die Heparansulfat-Seitenkette von CD44v3 blockiert wird und so die FGF2-Bioaktivität abnimmt.

Auch die Therapie mit Antikörpern, die gegen bestimmte Epitope von Tumoren gerichtet sind, ist eine bekannte Strategie, neue Anti-Tumor-Therapeutika zu entwickeln. Ein gutes Beispiel ist die v6-Isoform des HA-Rezeptors CD44. Die Isoform des CD44-Rezeptors CD44v6 kommt überwiegend in Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinomen verschiedener Herkunft vor. Sie wird aber selten in nichtepithelialen Tumoren beobachtet. In nicht-malignen Geweben ist die CD44v6-Expression auf einen Teil der Epithelyen begrenzt. Deshalb ist CD44v6 ein attraktives Ziel für die mit Antikörpern geführte Therapie bei verschiedenen Tumoren, die von Epithelyen stammen (Heider *et al.*, 2004).

Paris *et al.*, 2005, untersuchten die Inhibierung der Angiogenese und des Tumorwachstums durch beta- und gamma-Sekretase-Inhibitoren und fanden eine neue Klasse antiangiogenetischer und antitumoraler Komponenten. Beta- und Gamma-Sekretasen sind Enzyme, die bei der Bildung von Plaques bei der Alzheimer Erkrankung eine zentrale Rolle spielen. Der Focus der Forschung lag auf dem Design von Inhibitoren gegen diese Proteasen. Interessanterweise spaltet die Gamma-Sekretase zahlreiche Proteine wie Notch, E-Cadherin, CD44 und ErbB-4, die wichtige Modulatoren der Angiogenese sind. Die getesteten Inhibitoren gegen diese Enzyme reduzierten die Proliferation der Endothelzellen ohne zelluläre Toxizität zu induzieren. Sie unterdrückten die Bildung von Kapillarstrukturen *in vitro* und inhibierten das Wachsen der Mikrogefäße im Aorta-Ring-Modell bei Ratten. Sie inhibierten das Wachstum und die Vaskularisierung von humanen Glioblastomzellen und humanen

Lungenadenokarzinomzellen, die in Mäuse xenotransplantiert wurden. Diese Daten zeigen, dass die gamma- und beta-Sekretasen auch bei der Angiogenese eine essentielle Rolle spielen und die Inhibitoren dieser Enzyme eine neue Klasse der Anti-Tumor-Medikamente sind.

Hyaluronidasen werden auch von Flavonoiden gehemmt. Kuppusamy *et al.*, 1990, untersuchten die Wirkung von fünf der wirksamsten Flavonoide Tannin, Luteolin, Apigenin, Kampherol und Silybin als Hyaluronidase-Inhibitoren. Sie zeigten kompetitive Hemmwirkung. Am effektivsten war Silybin. Tannin zeigte den geringsten Effekt. Aglykone waren stärkere Inhibitoren als die entsprechenden Glykoside.

Bikunin ist ein Protease-Inhibitor von Proteasen des Kunitz-Typs, der hauptsächlich in der humanen Amnionflüssigkeit gefunden wird. In der Tumorthherapie könnte die Gabe von Bikunin die Tumorzelleninvasion blockieren, indem eine direkte Inhibierung der tumorzellassoziierten Plasminaktivität wie auch die Inhibierung des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ auf dem Gen- und Proteinniveau stattfindet. Dabei werden die CD44-Dimerisierung und die MAP-Kinase-Signalkaskade inhibiert (Kobayashi *et al.*, 2003).

Neue Erkenntnisse sind auch von der weiteren Erforschung von Empirin (extracellular matrix metalloproteinase-inducer, Basigin oder CD147) zu erwarten. Empirin ist ein „Up-stream“-Regulator der HA-Produktion. Der Empirin-Gehalt auf der Oberfläche von Tumorzellen korreliert mit der Multidrug Resistance. Hier würde es helfen, Empirin-Antagonisten zu finden.

Es gibt zwei große Bereiche der Resistenz gegen Arzneimittel während der Chemotherapie: die intrinsische und die erworbene Resistenz. Beide Bereiche werden in allen Tumoren und allen Arten von Chemotherapien beobachtet. Deshalb gibt es die Notwendigkeit vor diesem Phänomen zu schützen oder es rückgängig zu machen. Man kann entweder Medikamente entwickeln, die frei von Resistenz sind, wie zum Beispiel die direkt agierenden Angiogenese-Inhibitoren. Die antiangiogenetische Therapie

induziert keine erworbene Medikamenten-Resistenz. Eine weitere Strategie ist die Entwicklung von Methoden, die die Effektivität der bisher benutzten konventionellen Medikamente wie Adriamycin, Cyclophosphamid und Taxol signifikant verbessern. Es wurde eine neue Klasse von Chemosensibilisoren gefunden, die als antiadhäsive Agenzien das erste Tumorgewebe stärker durchlässig für die konventionellen zytotoxischen therapeutischen Medikamente machen. Ein Beispiel dafür sind Hyaluronidasen und das Emu-Maus-Modell. Wenn die Spheroide des EMT-6-Tumors mit der Enzympräparation behandelt werden, disaggregieren die Spheroide stark. Dispergierte Spheroide sind für die zytotoxischen Effekte der Cyclophosphamide stärker anfällig als die intakten Spheroide (St Croix *et al.*, 1998).

Wir betrachten die neuen Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Verteilungsmusters von CD44 und HA in den untersuchten Regionen (TU-Stroma gegenüber Infiltrationsrand) des tumorösen Geschehens als entscheidend für alle hier genannten Ansätze neuer Tumorthapien. Sie könnten einerseits den limitierenden Faktor für die Effektivität dieser Therapieansätze als Einzelmaßnahme darstellen, andererseits könnten synergistische Effekte durch die Kombination der regionalen Angriffsmöglichkeiten der einzelnen Therapien genützt werden.

Ob es möglich sein wird aus den hier gewonnenen Erkenntnissen praktischen therapeutischen Nutzen ziehen zu können, wird also durch zukünftige Forschungen zu klären bleiben.

E. Zusammenfassung

Hyaluronsäure (HA) ist ein weit verbreitetes Glykosaminoglykan in der Extrazellulärmatrix vieler Gewebe und tritt in soliden Tumoren in erhöhten Konzentrationen auf. Es handelt sich um ein hydrophiles Makromolekül, das durch seine hygroskopischen und osmotischen Eigenschaften stark an den physikalischen Gegebenheiten der Matrix beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass hochmolekulare HA von Hyaluronidasen in kleinere Fragmente gespalten wird. Sowohl hochmolekulare HA als auch die HA-Fragmente haben verschiedene physiologische Wirkungen und sind an der Tumorangiogenese und Metastasierung beteiligt. Große HA-Moleküle sind raumfüllend und verhindern das Kapillarwachstum, während die kleineren Fragmente (4-20 Disaccharide) die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* stimulieren. Diese Fragmente induzieren die Transkription von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und das Erkennen von Verletzungen durch Endothelzellen. Oligomere mit 6-20 Da induzieren z. B. die Expression von inflammatorischen Genen in dendritischen Zellen. Die Tetrasaccharide induzieren die Expression von Hitzeschock-Proteinen und sind anti-apoptotisch. Sie unterdrücken den Zelltod.

Ähnlich wie beim Abbau von Glykogen liegen sowohl der Ort der Synthese (HA-Synthasen), die HA-Rezeptoren (z.B. CD44 und RHAMM), Hyaluronidasen, Hyaluronidase-Inhibitoren, β -Exoglykosidasen und HA-bindende Proteine wie HABPI eng zusammen. Es wurde ein eigenes Organell, das Hyaluronasom, postuliert, also eine Funktionseinheit, die Auf- und Abbau der Hyaluronsäure regelt.

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Hyaluronat bei der Tumorangiogenese und Metastasierung von Pankreas- und Magenkarzinomen untersucht werden. Dazu wurden die Verteilung und die Lokalisation von HA und ihren Fragmenten bei Pankreaskarzinom- und Magenkarzinompatienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Außerdem sollten anhand der aktuellen Literatur Therapieansätze zur Tumorthherapie mit Hyaluronsäure unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse recherchiert werden.

Der Vergleich der Serumkonzentrationen von HA in Pankreas- und Magenkarzinompatienten zeigte gegenüber der gesunden Kontrollgruppe tendenziell eine leichte Erhöhung. Sie schwankten aber so stark, dass sich keine statistische Signifikanz nachweisen ließ. Dies ist durch die extrem kurze Halbwertszeit der Hyaluronsäure in vivo von 2,5-5 Minuten erklärbar. Damit erscheint eine Anwendung der Bestimmung der Serumkonzentration von Hyaluronat bei den untersuchten Patientengruppen zum Zwecke der klinischen Beurteilung von Tumoraggressivität, -ausbreitung oder Prognose in praxi nicht sinnvoll möglich.

Die Verteilung der HA im Tumorstroma und -gewebe wurde sowohl mittels Verteilungsschomatografie (zur Bestimmung der Größe der HA-Fragmente) als auch immunhistochemisch (zur Lokalisation der HA) in Gewebeproben von Pankreas- und Magenkarzinomen untersucht. Die gefundenen Daten entsprachen grundsätzlich den in der Literatur für andere Tumorarten publizierten Ergebnissen. Diese erscheinen nunmehr auch auf Magen- und Pankreaskarzinome übertragbar.

Hochmolekulare HA wird von Hyaluronidasen bei Patienten mit den in dieser Arbeit berücksichtigten Malignomen gegenüber den der gesunden Kontrollgruppe angehörenden Patienten verstärkt in kleinere Fragmente gespalten, die ihrerseits einen wichtigen Beitrag zur Neoangiogenese und Informationsübertragung leisten.

Das Koppeln von HA an Chemotherapeutika wie zum Beispiel Doxorubicin (DOX) oder 5-Fluorouracil führt zu einer Reduktion der Toxizität und verbesserter lokaler Wirksamkeit.

Ein weiterer wichtiger Ansatz für die Optimierung der Tumorthapien können sowohl die Hemmung des HA-Rezeptors CD44 oder der HA-Synthese sein. So führte die Inhibierung von HAS2 zur Unterdrückung der Progression der primären und sekundären Tumorbildung bei Brustkrebszellen.

Laminin alpha5 A5g227, ein Peptid, bindet an den CD44-Rezeptor und inhibiert die Tumorzellenmigration, Invasion und die Angiogenese.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die hier beschriebenen Ansätze zur Tumorthapie weiter zu optimieren.

F. Literaturverzeichnis

Adamia, S., Maxwell, C.A., Pilarski, L.M., 2005: Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 5(1): 3-14.

Adams, D.H., Wang, L., Hubscher, S.G., Neuberger, J.M., 1989: Hepatic endothelial cells. Targets in liver allograft rejection? *Transplantation* 47: 479-482.

Alaish, S.M., Yager, D., Diegelmann, R.F., Cohen, I.K., 1993: Hyaluronate receptor expression in fetal fibroblasts. *Surg. Forum* 44: 733-735.

Alsalameh, S., Kalden, J.R., Strohmaier, B., Hiesche, K., Stock, K.-P., Burmester, G.R., 1990: Hyaluronsäure im Serum von Patienten mit entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen-Ergebnisse einer Studie und Übersichtsreferat. *Akt. Rheumatol.* 15: 133-140.

Andrews, P., 1965: The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96: 595-606.

Andrews, P. 1970: Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Biochemical Analysis*, 18: 1-53.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B., 1990: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61: 1303-1313.

Asplund, T., Brinck, J., Suzuki, M., Briskin, M.J., Heldin, P., 1998: Characterization of hyaluronan synthase from a human glioma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1380: 377-388.

Assmann, V., Marshall, J.F., Fieber, C., Hofmann, M., Hart, I.R. 1998: The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J. Cell. Sci.* 111: 1685-1694.

Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J.F., Hart, I.R., 1999: The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell. Sci.* 112: 3943-3954.

Asteriou, T., Vincent, J.C., Tranchepain, F., Deschrevel, B., 2005: Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. *Matrix Biol.* In press.

Ausprunk, D. H., Folkmann, J., 1977: Migration and proliferation of endothelial cells in reformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14: 53-65.

Auvinen, P., Tammi, R., Tammi, M., Johansson, R., Kosma, V.M., 2005: Expression of CD44s, CD44v3 und CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. *Histopathol.* 47(4): 420-428.

Berg, S., Brodin, B., Hesselvik, F., Laurent, T.C., Maller, R., 1988: Elevated levels of plasma hyaluronan in septicaemia. *Cand. J. Clin. Lab. Invest.* 48: 727-732.

Berg, S., 1997: Hyaluronan turnover in relation to infection and sepsis. J. Intern. Med. 242: 73-77.

Bisle, D.E., Zychond, E.; 1993: Assembly of the extracellular matrix during tendon development in the chicken limb. Limb development and regeneration. Proceedings of the Fourth International Conference on Limb Development and Regeneration. 1992 July. Asilomar (CA). New York. Wiley-Liss. 523-532.

Blood, C.H., Zetter, B.R., 1990: Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. Biochem. Biophys. Acta 1032: 82-118.

Carter, W.G., Wayner, E.A., 1988: Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. J. Biol. Chem. 263: 4193.

Chang, N.S., 2002: Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts. BMC Cell Biol. 3: 8.

Clarris, B.J., Fraser, J.R.E., 1968: On the pericellular zone of some mammalian cells *in vitro*.

Exp. Cell. Res. 49: 181-193.

Constantini, V., Zacharski, L.R., 1993: Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. Exp. Cell Res. 248: 407-414.

Coradini, D., Pellizzaro, C., Abolafio, G., Bosco, M., Scarlata, I., Cantoni, S., Stucchi, L., Zorzet, S., Turrin, C., Sava, G., Perbellini, A., Daidone, M.G., 2004: Hyaluronic-acid butyric esters as promising antineoplastic agents in human lung carcinoma: a preclinical study. *Invest. New Drugs*. 22(3): 207-217.

Croce, M.A., Boraldi, F., Quaglino, D., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I., 2003: Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts *in vitro*. *Eur. J. Histochem*. 47: 63-74.

Csoka, T.B., Frost, G.I., Heng, H.H., Scherer, S.W., Mohapatra, G., Stern, R., 1998: The hyaluronidase gene *Hyal1* maps to chromosome 3p21.2-P21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics* 48: 63-70.

Culty, M., Nguyen, H.A., Underhill, 1992: The hyaluronan receptor CD44 participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell Bio*. 116: 1055-1062.

Dahl, I.M.S., Sohlheim, O.P., Erikstein, B., Müller, E., 1989: A longitudinal study of the hyaluronan level in the serum of patients with malignant mesothelioma under treatment. *Cancer* 64: 68-73.

Day, A.J., Sheehan, J.K., 2001: Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 11: 617-622.

Dejana, E., Languino, L.R., Polentarutti, N., Balconi, G., Ryckewaert, J.J., Larrieu, M.J., Donati, M.B., Mantovani, A., Margurie, G., 1985: Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *J. Clin. Invest*. 75: 11-18.

Del Fresno, C., Otero, K., Gomez-Garcia, L., Gonzales-Leon, M.C., Soler-Ranger, L., Fuentes-Prior, P., Escoli, P., Baos, R., Caveda, L., Garcia, F., Arnalich, F., Lopez-Collazo, E., 2005: Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR 4. *J. Immunol.* 174: 3032-3040.

Delmage, J.M., Powars, D.R., Jaynes, P.K., Allerton, S.E., 1986: The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 16: 303-310.

Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M.N., Chauzy, C., Delpech, A., 1997: Hyaluronan: fundamental principles and application in cancer. *J. Intern. Med.* 1997: 242: 41-48.

Delpech, B., Maingonnat, C., Girad, N., Chauzy, C., Maunoury, R., Olivier, A., Tayot, J., Creissard, P., 1993: Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer* 29A(7): 1012-1017.

Denning, S.M., Le, P.T., Singer, K.H., Haynes, B.F., 1990: Antibodies against CD44 p80 lymphocytes homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol.* 144(1): 7-15.

DePalma, R.L., Krummel, T.M., Durham, L.A., Michna, B.A., Thomas, B.L., Nelson, J.M., Diegelmann, R.F., 1989: Characterization and quantitation of wound matrix in the fetal rabbit. *Matrix* 9: 224-231.

Docherty, R., Forester, J.V., Lackie, J.M., Gregory, D.W., 1989: Glycosaminoglycans facilitate the movement of fibroblasts through three-dimensional collagen matrices. *J. Cell Sci.* 92: 263-270.

Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Manseau, E.J., Wiberger, L., Churchill, W.H., 1979: Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage and infarction in line 1 tumor regression. *J. Natl. Cancer Inst.* 2: 1459-1472.

Eggl, P.S., Graber, W., 1995: Association of hyaluronan with rat vascular endothelial and smooth muscle cells. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 689-697.

Ekici, S., Cerwinka, W.H., Duncan, R., Gomez, P., Civantos, F., Soloway, M.S., Lokeshwar, V.B., 2004: Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 und microvessel density for prostate cancer. *Int. J. Cancer* 112: 121-129.

Engström-Laurent, A., 1989: Changes in hyaluronan concentration in tissue and body fluids in disease states. In: *The Biology of Hyaluronan*. Ciba Foundation Symposium 143: 233-247.

Engström-Laurent, A., Laurent, T.C., 1989: Hyaluronan as a clinical marker. In: *Clinical Impact of bone connective Tissue Markers*. Lindh, E., Thorell, J.I. (eds.). 235-252. Academic. London. England.

Esser, S., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., Risau, W., 1998: Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations *in vitro*. *J. Cell. Biol.* 140: 947-959.

Evanko, S.P., Angello, J.C., Wight, T.N., 1999: Formation of hyaluronan and versican rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 004-0013.

Feinberg, R.N., Beebe, D.C., 1983: Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220: 1177-1179.

Ferrarra, J.J., Reed, R.K., Dyess, D.J., Townsley, M.I., Onarheim, H., Laurent, T.C., Taylor, A.E., 1991: Increased hyaluronan flux from skin following burn injury. *J. Surg. Res.* 20: 240-244.

Fieber, C., Baumann, P., Vallon, R., Termeer, C., Simon, J.C., Hofmann, M., Angel, P., Herrlich, P., Sleeman, J.P., 2004: Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J. Cell. Sci.* 117: 359-367.

Filion, M.C., Philips, N.C., 2002: Pro-inflammatory activity of contaminating DNA in hyaluronic preparations. In: "Hyaluronan-chemical, biochemical and biological aspects." Kennedy, J. F., Phillips, G.O., Williams, P.A., Hascall V. C., (eds.) Woodhead Publishing Ltd. Abington Hall. Abington. 428-434.

Fisner-Szafarz, B., 1968: Demonstration of a new hyaluronidase inhibitor in serum of cancer patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129: 300-302.

Folkman, J., 1984: Angiogenesis. In: Jaffe, E.A. (ed.), *Biology of endothelial cells.* Martinus Nijhoff. Netherlands. 412-428.

Folkman, J., 1987: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447.

Folkman, J., 1992: The role of angiogenesis in tumor growth. *Sem. Cancer Biol.* 3: 65-71.

Forsberg, N., Gustafson, S., 1991: Characterization and purification of the hyaluronan-receptor on liver endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1078(1): 12-18.

Fraser, J. R., Appelgren, L.E., Laurent, T.C. 1983: Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. A whole body autoradiographic study. *Cell and Tissue Research* 233: 285-289.

Fraser, J. R., Laurent, T.C., Engström-Laurent, A., Laurent, U.G., 1984: Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 11(1): 17-25.

Fraser, J.R., Kimpton, W.G., Laurent, T.C., Cahill, R.N., Vakakis, N., 1988: Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.* 256(1): 153-158.

Fraser, J. R., Laurent, T.C., Laurent, U.B., 1997: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 242:27-33.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., Birchmeier, W. 1991: E-Cadherin mediated cell-cell-adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113: 173-185.

Frost, G. I., Csoka, T., Stern, R. 1996: The Hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends. Glycosci. Glycotechnol.* 8: 419-434.

Ghosh, P., 1994: The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clinical and Experimental Rheumatology* 12: 75-82.

Gmachl, M., Sagan, S., Ketter, S., Kreil, G., 1993: The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* 336: 545-548.

Goussia, I.E., Agnantis, N.J., 1999: Glycoprotein CD44 expression in colorectal neoplasms. An immuno-histochemical study including correlation with cathepsin D, extracellular matrix components, p53, Rb, bel-2, c-erbB-2, EGFR und proliferation indices. *Virchows. Arch.* 434(1): 45-50.

Grinnell, F., 1984: Fibronectin and wound healing. *J. Cell Biochem.* 26: 107-116.

Hanahan, D., Folkman, J., 1996: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.

Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H.P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D.M., Turley, E.A., 1992: Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J. Cell. Biol.* 117: 1343-1350.

Hayen, W., 2001: Determinanten der Tumorzellmigration: Hyaluronsäure stimuliert die ungerichtete, endotheliale Faktoren die gerichtete dreidimensionale Migration von Tumorzellen. *Diss. Universität Würzburg*, p. 79-82.

Haynes, B.F., Telen, M.J., Hale, L.P., Denning, S.M. 1989: CD44-a molecule involved in leukocyte adherence and T cell activation. *Immunol. Today* 10: 423.

Heider, K.H., Kuthan, H., Stehle, G., Munzert, G., 2004: CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53(7): 567-579.

Heldin, P., Pertoft, H., 1993: Synthesis and assembly of the hyaluronan containing coats around mesothelial cells. *Exp. Cell Res.* 208: 422-429.

Hibino, S., Shibuya, M., Hoffman, M.P., Engbring, J.A., Hossain, R., Mochizuki, M., Kudoh, S., Nomizu, M., Kleinman, H.K., 2005: Laminin alpha5 chain metastasis- and angiogenesis-inhibiting peptide blocks fibroblast growth factor2 activity by binding to the heparan sulfate chains of CD44. *Cancer Res.* 65(22): 10494-10501.

Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Gottlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H., Herrlich, P. 1998: Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J. Cell. Sci.* 111: 1673-1684.

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 1999: Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284: 1994-1998.

Hudlicka, R., 1991: Fibronectins. *Sci. Am.* 254: 42-51.

Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, M., Bernard, A.; 1989: CD44 contributes to cell activation. *J. Immunol.* 143: 798.

Hynes, W.L., Walton, S. L., 2000: Hyaluronidases of gram-positive bacteria FEMS. *Microbiol. Lett.* 183: 201-207.

Isoyama, T., Thwaites, D., Selzer, M.G., Carey, R.I., Barbucci, R., Lokeshwar, V.B., 2006: Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. *Glycobiol.* 16(1): 11-21.

Itano, N., Sawai, T., Miyaishi, O., Kimata, K., 1999: Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.*, 59: 2499-2504.

Jalkanen, S., Jalkanen, M., 1992: Lymphocyte CD44 binds COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell. Biol.* 116: 817-825.

Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L.V., Ojima, I., 2005: Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg. Med. Chem* 13(17): 5043-5054.

Ji, L., Nishizaki, M., Gao, B., Burbee, D., Kondo, M., Kamibayashi, C., Xu, K., Yen, N., Atkinson, E.N., Fang, B., Lerman, M.I., Roth, J.A., Minna, J.D., 2002: Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 62: 2715-2720.

Jiang, W.G., Puntis, M.C.A., Hallett, M.B., 1994: Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *British J. Surg.* 81: 1576-1590.

Junker, N., Latini, S., Petersen, L.N., Kristjansen, P.E., 2003: Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol. Rep.* 10: 609-616.

Kamikura, D. M., Khoury, H., Maroun, C., Naujokas, M. A., Park, M., 2000: Enhanced transformation by a plasma-membrane associated Met oncoprotein: activation of a phosphoinositide-3`kinase-dependent autocrine loop involving hyaluronic acid and CD44. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3482-3496.

Karvinen, S., Pasonen-Seppanen, S., Hyttinen, J. M., Pienimäki, J. M., Toronen, K., Jokela, T.-A., Tammi, M. I., Tammi, R., 2003: Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of hyaluronan synthases 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 278: 49495-49504.

Kawano, T., Yanoma, S., Nakamura, Y., Shiono, O., Kokatu, T., Kubota, A., Furukawa, M., Tsukuda, M., 2005: Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am. J. Otolaryngol.* 2(5): 308-313.

Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J. L., Vassalli, P., Stamenkovic, I., 1997: Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev.* 11: 996-1007.

Kobayashi, H., Suzuki, M., Hirashima, Y., Terao, T., 2003: The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol. Chem.* 384(5): 749-754.

Kok, K., Osinga, J., Carritt, B., Davis, M.B., van der Hout, A.H., van der Veen, A.Y., Landsvater, R.M., de Leij, L.F., Berendsen, H.H., Postmus, P.E., 1987: Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* 330: 578-781.

Koochekpour, S., Pilkington, G.J., Merzak, A., 1995: Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells *in vitro*. *Int. J. Cancer* 63: 450-454.

Kosaki, R. Watanabe, K., Yamaguchi, Y., 1999: Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase HSs2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.* 59: 1141-1145.

Knudson, C.B., Toole B.P. 1985: Changes in pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Devel. Biol.* 112: 308-318.

Knudson, W., Chow, G., Knudson, C.B., 2002: CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.* 21: 15-23.

Kreil, G., 1995: Hyaluronidases-group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 4: 1666-1669.

Kuppusamy, U.R., Khoo, H.E., Das, N.P., 1990: Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidases. *Biochem. Pharmacol.* 40(2): 397-401.

Lacy, B.E., Underhill, C.B., 1987: The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell. Biol.* 105: 1395-1404.

Larnier, C., Kerneur, C., Robert, L., Moczar, M., 1989: Effect of testicular hyaluronidase on hyaluronate synthesis by human skin fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 1014(2): 145-152.

Laurent, T.C., Fraser, J.R., 1992: Hyaluronan. *FASEB J.* 6: 2397-2404.

Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J.R., 1996: Hyaluronan as a disease marker. *Ann. Med.* 28(3) 241-253.

Lawrence, W.T., Diegelmann, R.F., 1994: Growth factors in wound healing. Clin. Dermatology 12: 157-169.

Le Baron, R.G., Zimmermann, D.R., Ruoslahti, E., 1992: Hyaluronate binding properties in versican. J. Biol. Chem. 267: 1003-1010.

Li, H., Guo, L., Li, J.W., Liu, N., Qi, R., Liu, J., 2000: Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancer; relevance with tumor progression. Int. J. Oncol. 17: 927-932.

Lindquist, U., 1997: Is serum hyaluronan a helpful tool in the management of patients with liver diseases?. J. Intern. Med. 242: 67-71.

Liotta, L.A., 1987: Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastases. Clin. Physiol. Biochem. 5: 190-199.

Liu, D., Pearlman, E., Guo, E.D.K., Mori, H., Haqqi, S., Markowitz, S., Willson, J., Sy, M.S., 1996: Expression of hyaluronidase in tumor cells induces angiogenesis *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7832-7837.

Longaker, M.T., Chiu, E.S., Harrison, M.R., Crombleholme, T.M., Langer, J.C., Duncan, B.W., Adzick, N.S., Verrier, N.D., Stern, R., 1989: Studies in fetal wound healing. IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. Ann. Surg. 210: 667-672.

Lopez, J. I., Camenisch, T. D., Stevens, M.V., Sande, B.J., McDonald, J., Schroeder, J.A., 2005: CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. Cancer Research 65: 6755-6763.

Maeda, N., Palmarini, M., Murgia, C., Fan, H., 2001: Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4449-4454.

Mast, B.A., Flood, L.C., Haynes, J.H., DePalma, R.L., Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Krummel, T.M., 1991: Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration. *Matrix* 1: 63-68.

Mast, B.A., 1992: The skin. In: Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J., (eds.). *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia. Saunders. 344-355.

Mast, B.A., Diegelmann, R.F., Krummel, T.M., Cohen, I.K., 1993: Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix* 13: 441-446.

Mast, B.A., Frantz, .F.W., Diegelmann, R.F., Krummel, T.M., Cohen, I.K., 1995: Hyaluronic acid degradation products induce neovascularization and fibroplasia in fetal rabbit wounds. *Wound Rep. Reg.* 3: 66-72.

McBride, W.H., Bard, J.B., 1979: Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 149: 507-515.

McGary, C. T., Castellot, J.J., Orkin, R.W., 1987: Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling. *Biochem. J.* 257: 875-884.

McGuire, P.G., Castellot J.J., Orkin, R.W. 1987: Size-dependent hyaluronate degradation by cultured cells. *J. Cell Physiol.* 133: 267-276.

Menzel, E. J., Farr, C. 1998: Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* 131: 3-11.

Mian, N. 1986a: Analysis of cell growth-phase-related variations in hyaluronate synthase activity of isolated plasma-membrane fractions of cultured human skin fibroblasts. *Biochem. J.* 237: 333-342.

Mian, N. 1986b: Characterization of a high-M_r plasma-membrane-bound protein and assessment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *Biochem. J.* 237: 343-357.

Miller, E.J., Gay, S. 1992: Collagen structure and function. In: Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J. (eds.). *Wound healing: biochemical and clinical aspects.* Philadelphia. Saunders. 130-151.

Mio, K., Carrette, O., Maibach, H.I., Stern, R., 2000: Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter- α -inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 275: 32413-32421.

Mio, K., Stern, R., 2002: Inhibitors of hyaluronidases. *Matrix Biol.* 21(1): 31-37.

Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., Kincade, P.W., 1990: Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172: 69.

Montesano, R., Kumar, S., Orci, L., Pepper, M. S., 1996: Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis *in vitro*. Lab. Investig. 75: 249-275.

Moseley, R., Waddington, R.J., Embery, G., 1997: Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leucocytes. Biochim. Biophys. Acta. 1362: 221-231.

Myint, P., Deeble, D.J., Beaumont, P.C., Blake, S.M., Philips, G.O., 1987: The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid steady-state and pulse radiolysis studies. Biochim. Biophys. Acta 925: 194-202.

Nakazawa, H., Yoshibara, S., Kudo, D., Morohashi, H., Kakizaki, I., Kon, A., Takagaki, K., Sasaki, M., 2006: 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. Cancer Chemother. Pharmacol. 57(2): 165-170.

Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., Faitelson, Y., 2002: CD44 in cancer. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 39(6): 527-579.

Naujokas, M.F., Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M., Miller, J., 1993: The chondroitin sulfate of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. Cell 74: 257.

Nehls, V., Herrmann, R., 1996: The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. Microvasc. Res. 5: 347-364.

Noble, P.W., 2002: Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 21: 25-29.

Novak, U., Stylli, S.S., Kaye, A.H., Lepperdinger, G., 1999: Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* 59: 6246-6250.

Okorukwu, O.N., Vercruysse, K.P., 2003: Effects of ascorbic acid and analogs on the activity of testicular hyaluronidase and hyaluronan lyase on hyaluronan. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 18: 377-382.

Oliferenko, S., Kaverina, I., Small, J.V., Huber, L.A., 2000: Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia growth. *J. Cell Biol.* 148: 1159-1164.

Onarheim, H., Missavage, A.E., Gunther, R.A., Kramer, G.C., Reed, R.K., Laurent, T.C., 1991: Marked increase of plasma hyaluronan after major thermal injury and infusion therapy. *J. Surg. Res.* 50: 259-265.

Paris, D., Quadros, A., Patel, N., DelleDonne, A., Humphrey, J., Mullan, M., 2005: Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma secretase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 514(1): 1-15.

Peer, D., Margalit, R., 2004: Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngenic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia* 6(4): 343-353.

Peterson, R. M., Yu, Q., Stamenkovic, I., Toole, B. P., 2000: Perturbations of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites. *Am. J. Pathol.* 156: 2159-2167.

Philipson, L.H., Schwartz, N.B., 1984: Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells. *J. Biol. Chem.* 259: 5017-5023.

Philipson, L.H., Westley, J., Schwartz, N.B., 1985: Effect of hyaluronidase treatment of hyaluronan of intact cells on hyaluronate synthase activity. *Biochem.* 24: 7899-7906.

Porath, J., Flodin, P., 1959: Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature* 183: 1657-1659.

Potgens, A.J., Westphal, H.R., de Waal, R.M., Ruiter, D.J., 1995: The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 376(2): 57-70.

Potschka, M., 1987: Universal calibration of gel permeation chromatography and determination of molecular shape in solution. *Anal. Biochem.* 162: 47-64.

Prehm, P., 1989: Identification and regulation of the eukaryotic hyaluronate synthase. *Ciba. Found. Symp.* 143: 21-30.

Prehm, P., 1984: Hyaluronidase is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* 220: 597-600.

Rai, S.K., Duh, F.M., Vigdorovich, V., Danilkevitch-Miagkova, A., Lerman, I., Miller, A.D., 2001: Candidate tumor suppressor Hyal2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-

anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4443-4448.

Rall, C.J., Rustigi, A.K., 1995: CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55(9): 1831-1835.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., Schmitt, M., 1998: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int. J. Oncol.* 13: 893-906.

Roberts, W.G., Palade, G.E., 1997: Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57: 765-772.

Rooney, P., Kumar, S., Ponting, J., Wang, M., 1995: The role of hyaluronan in tumor neovascularisation. *Int. J. Cancer* 60(5): 632-636.

Ropponen, K., Tammi, M., Parkkinen, J., Eskelinen, M., Tammi, R., Lipponen, P., Agren, U., Alhava, E., Kosma, V. M., 1998: Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 342-347.

Rosenthal, M.A., Gibbs, P., Brown, T.J., Wong, S., Uren, S., Ellis, A., Li, L., Heldin, P., Fox, R.M., 2005: Phase I and pharmacokinetic evaluation of intravenous hyauronic acid in combination with doxorubicin or 5-fluorouracil. *Chemother.* 51: 132-141.

Rousseau, B., Tateya, I., Lim, X., Munoz-Del-Rio, A., Bless, D.M., 2005: Investigation of anti-hyaluronidase treatment on vocal fold wound healing. *J. Voice*. In press.

Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y., 1991: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64(5): 867-869.

Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y., Hildebrand, A., Border, W.A., 1992: Extracellular matrix/growth factor interactions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 57: 309-315.

Schor, A.M., Schor, S.L., 1983: Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* 142: 385-413.

Schwarz, A., 1996:

Schwarz, A., 2003: Preventive gastroectomy in patients with gastric cancer risk due to genetic alterations of the E-Cadherin gene defect. *Langenbecks Arch. Surg.* 388(1): 27-32.

Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., Bell, J.I., 1992: Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 89: 12160-12164.

Setälä, L.P., Tammi, M.I., Tammi, R.H., Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K., Agren, U.M., Parkkinen, J., Alhava, E.M., Kosma, V.-M., 1999: Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Brit. J. Cancer* 79: 1133-1138.

Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., Ponta, H. 1994: Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 726-733.

Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Siraganian, R., Wahl, L., Shaw, S., 1989: Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* 143: 2457-2463.

Simpson, M.A., Wilson, C. M., McCarthy, J. B., 2002: Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am. J. Pathol.* 161: 849-857.

Skinner, S.A., Tuton, P.J., O'Briaen, P.E., 1990: Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* 50: 2411-2417.

Sleeman, J.P., Arming, S., Moll, J.F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L.S., Kreil, G., Ponta, H., Herrlich, P., 1996: Hyaluronate-independent metastatic behaviour of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 56(13): 3134-3141.

Slevin, M., Krupinski, J., Kumar, S., Gaffney, J., 1998: Angiogenetic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosin kinase activity in endothelia cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab. Invest.* 78: 987-1003.

Speranza, A., Pellizzaro, C., Coradini, D., 2005: Hyaluronic acid butyric esters in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16(4): 373-379.

Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., Seed, B. 1991: The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells. *EMBO. J.* 10: 343-348.

St Croix, B., Man, S., Kerbel, R.S., 1998: Reversal of intrinsic and acquired forms of drug resistance by hyaluronidase treatment of solid tumors. *Cancer Lett.* 131(1): 35-44.

Stedler-Stevenson, Aznavoriaan, S., Liotta, L. A., 1993: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:541-573.

Stern, R., Shuster, S., Wiley, T.S., Formby, B., 2001: Hyaluronidase can modulate expression of CD44. *Exp. Cell. Res.* 276: 24-31.

Stern, R., 2004: Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell* 83(7) 317-325.

St. John, T., Meyer, J., Idzerda, R., Gallatin, W.M., 1990: Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* 60: 45.

Sugahara, K.N., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T., Miyasaka, M., 2005: Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J. Biol. Chem.* In press.

Sun, L. K., 2002: Enhanced thromboxane synthesis through the induction of cyclooxygenase-2 by hyaluronan in renal cells. In: "Hyaluronan-chemical, biochemical and biological aspects." Kennedy, J. F., Phillips, G.O., Williams, P.A., Hascall V. C., (eds.). Woodhead Publishing Ltd. Abington Hall. Abington. 2002. 501-507.

Svee, K., White, J., Vaillant, P., Jessurun, J., Roongta, U., Krumwiede, M., Johnson, D., Henke, C., 1996: Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J. Clin. Invest.* 98: 1713-1727.

Tammi, R., Rilla, K., Pienimäki, J.P., MacCallum, D. K., Hogg, M., Luukkonen, M., Hascall, V.C., Tammi, M., 2001: Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J. Biol. Chem.* 276: 35111-35122.

Tanabe, K.K., Nishi, T., Saya, H., 1993: Novel variants of CD44 arising from alternative splicing: changes in the CD44 alternative splicing patterns of MCF-7 breast carcinoma cells treated with hyaluronidase. *Mol. Carcinog.* 7: 212-220.

Taylor, K.R., Trowbridge, J.M., Rudisill, J.A., Termeer, C.C., Simon, J.C., Gallo, R.L., 2004: Hyaluronan fragments stimulate dermal endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.* 279: 17079-17084.

Termeer, C.C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., Weiss, J.M., Prehm, P., Simon, J.C., 2000: Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.* 165: 1863-1870.

Termeer, C.C., Sleeman, J.P., Simon, J.C., 2003: Hyaluronan-magic glue for the regulation of the immune response? *Trends Immunol.* 24: 112-114.

Theocharis, A.D., Tsara, M.E., Papageorgacopoulou, N., Karavias, D.D., Theocharis, D.A., 2000: Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1502: 201-206.

Theocharis, A.D., Teocharis, D.A., 2002: High-performance capillary electrophoretic analysis of hyaluronan and galactosaminoglycan-disaccharides in gastrointestinal carcinomas. Differential disaccharide composition as a possible tool-indicator for malignancies. *Biomed. Chromatogr.* 16(2) 157-161.

Theocharis, A.D., Vynios, D.H., Papageorgacopoulou, N., Skandalis, S.S., Theocharis, D.A., 2003: Altered content composition and structure of glycosaminoglycans in gastric carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35(3): 376-390.

Thomas, L., Byers, H.R., Vink, J., Stamenkovic, I., 1992: CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J. Cell Biol.* 118: 971-974.

Thomas, L., Etoh, T., Stamenkovic, I., Mihm, M.C., Byers, H.R., 1993: Migration of human melanom cells on hyaluronate is related to CD44 expression. *J. Invest. Dermatol.* 100: 115-120.

Tomida, M., Koyama, H., Ono, T., 1975: Induction of hyaluronic acid synthetase activity in rat fibroblasts by medium change of confluent cultures. *Cell. Physiol.* 86(1): 121-130.

Toole, B.P., Biswas, C., Gross, J., 1979: Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6299-6303.

Toole, B.P., 1982: Developmental role of hyaluronate. *Connect Tissue Res.* 10: 93-100.

Toole, B.P., Banerjee, S.D., Turner, R., Munaim, S.I., Knudson, C.B. 1991: Hyaluronan interactions in limb bud development. *Developmental patterning of the vertebrate limb.* New York. Plenum Press. 215-223.

Toole, B.P., Turner, R.E., Banarjee, S.D., 1993: Hyaluronan-binding protein in chondrogenesis and angiogenesis. *Limb development and regeneration. Proceedings of the Fourth International Conference on Limb Development and Regeneration.* Asilomar (CA). New York. Wiley-Liss. 437-444.

Toole, B. P., 2001: Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12: 79-87.

Toole, B. P., Wight, T.N., Tammi, M.I., 2002: Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J. Biol. Chem.* 277: 4593-4595.

Toole, B. P., Hascall, V. C., 2002: Hyaluronan and tumor growth. *Am. J. Pathol.* 161: 745-747.

Toole, B. P., 2004: Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev.* 4: 528-539.

Tucker, R. P., Erickson, C.A. 1984: Morphology and behavior of quail neural crest cells in artificial three-dimensional extracellular matrices. *Dev. Biol.* 104: 390-405.

Turley, E. A., Torrance, J., 1985: Localisation of hyaluronate and hyaluronate-binding protein on motile and non-motile fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 161: 17-28.

Turley, E. A., Brassel, P., Moore, D., 1990: A hyaluronan-binding protein shows a partial and temporally regulated codistribution with actin on locomoting chick heart fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 187: 243-249.

Turley, E.A., 1992: Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 11: 21-30.

Turley, E.A., Noble, P.W., Bourguignon, L.Y., 2002: Signalling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 4589-4592.

Tzircotis, G., Thorne, R.F., Isacke, C. M., 2005: Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *J. Cell Science* 18: 5119-5128.

Uchiyama, H., Dobashi, Y., Ohkouchi, K., Nagasawa, K., 1990: Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 265: 7753-7759.

Udabage, L., Brownlee, G.R., Waltham, M., Blick, T., Walker, E.C., Heldin, P., Nilsson, S.K., Thompson, E.W., Brown, T.J., 2005: Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression in breast cancer. *Cancer Res.* 14: 6139-6150.

Underhill, C., 1992: CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* 103: 293-298.

Visse, R., Nagase, H., 2003: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ. Res.* 92: 827-839.

Vizoso, F.J., Del Casar, J.M., Corte, M.D., Garcia, I., Corte, M.G., Alvarez, A., Garcia-Muniz, J.L., 2004: Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 30(3): 318-324.

Wang, C., Tammi, M., Guo, H., Tammi, R. 1996: Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach and colon and their cancers. *AJP* 148 (6): 1861-1869.

Weber, G.F., Bronson, R. T., Hagan, J., Cantor, H., Schmits, R., Mak, T.W., 2002: Absence of CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res.* 62(8): 2281-2286.

Weigel, P.H., Hascall, V.C., Tammi, M., 1997: Hyaluronan synthases. J. Biol. Chem. 272: 13997-40000.

Wein, R.O., McGary, C.T., Doerr, T.D., Popat, S.R., Howard, J.L., Weigel, J.A., Weigel, P.H., 2005: Hyaluronan and its receptors in mucoepidermoid carcinoma. Inc. Head Neck. 27. In press.

Weiß, S., Jung, K., Lein, M., Schnorr, D., Loening, S., 1995: Grenzbereiche der löslichen Adhäsionsmoleküle CD44 (Standard), CD44(v5) und CD44(v6) im Serum gesunder Erwachsener. Lab. Med. 19: 373-376.

Weitzhandler, M., Bernfield, M.R., 1992: Proteoglycan Conjugates. In: Cohen IK, Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J., (eds.). Wound healing: biochemical and clinical aspects. Philadelphia. Saunders. 195-208.

Werb, Z., 1997: ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell 91(4) 439-442.

West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F., Kumar, S., 1985: Angiogenesis induces by degradation products of hyaluronic acid. Science 228: 1324-1328.

West, D.C., Kumar, S., 1987: Modulation of hyaluronate and its degradation products *in vitro*. In: Tsuchya, M. *et al.* (eds). Microcirculation – an update. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 2: 801-802.

West, D.C., Kumar, S., 1989: Hyaluronan and angiogenesis. The biology of hyaluronan. Wiley. Chichester (Ciba Foundation Symposium 143). 187-207.

Whitby, D.J., Ferguson, M.W.J., 1992: Immunohistochemical studies of the extracellular matrix and soluble growth factors in fetal and adult wound healing. In: Adzick, N.S., Longaker, M.T, (eds.). Fetal wound healing. New York. Elsevier. 161-179.

Xing, R., Regezi, J.A., Stern, M., Shuster, S., Stern, R., 1998: Hyaluronan and CD44 expression in minor salivary gland tumors. *Oral. Dis.* 4(4)- 241-247.

Xu, Y., Yu, Q., 2003: E-cadherin negatively regulates CD44 hyaluronan interaction and CD44 mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 8661-8668.

Yang, Y., Breadmore, M.C., Thormann, W., 2005: Analysis of the disaccharides derived from hyaluronic acid and chondroitin sulfate by capillary electrophoresis with sample stacking. *J. Sept. Sci.* 28 (17): 2381-2389.

Yoshida, A., Anand-Apte, B., Zetter, B.R., 1996: Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13: 57-64.

Yoshihara, S., Kon, A., Kudo, D., Nakazawa, H., Kakizaki, I., Sasaki, M., Endo, M., Takagaki, K., 2005: A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett.* 579 (12): 2722-2726.

Yoshinari, C., Mizusawa, N., Byers, H. R., Akasaka, T., 1999: CD44 variant isoform CD-44v10 expression of human melanoma cells lines is upregulated by hyaluronate and correlates with migration. *Melanoma Res.* 9: 223-231.

Yu, Q., Toole, B.P., Stamenkovic, I., 1997: Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells *in vivo* by disruption of tumor cell surface CD44 function. J. Exp. Med. 186: 1985-1996.

Yu, Q., Stamenkovic, I., 1999: Localisation of metalloproteinase 9 (MMP-9) to the cell surface provides a mechanism for CD44 mediated tumor invasion. Genes Dev. 13: 35-48.

Zeng, C., Toole, B.P., Kinney S.D., Kuo, J.W., Stamenkovic, I., 1998: Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers. Int. J. Cancer 77(3): 396-401.

Zetter, B. R., 1990: The cellular basis of site-specific metastasis. N. Engl. J. Med. 322: 605-610.

Zhang, S., Underhill, C.B., Chen, L. 1995: Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. Cancer Res. 55: 428-433.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 03.04.1973
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Sprachen: Deutsch, Englisch, Kroatisch, Latein

Ausbildung:

1979 – 1992: Schulausbildung an der Grundschule in der Kafkastraße in München und am Städt. Heinrich-Heine-Gymnasium in München

 Juli 1992–Juni 1993: Grundwehrdienst beim Flugabwehrregiment 200 in München

 ab Mai 1994: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

 16.11.2000: Abschluß des Studiums mit dem 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

Okt.1999 – Jan.2000: Chirurgisches Tertial in der Chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Großhadern, München, auf den Stationen der Abdominalchirurgie, Unfallchirurgie und Thoraxchirurgie

 Feb. - Mai 2000: Internistisches Tertial:
 - in der Kardiologie am Royal Prince Alfred Hospital, University of Sydney, Australien (2 Monate)
 - im Dep. of Gastroenterology am St. Michael's Hospital, University of Toronto, Kanada (2 Monate)

 Juni – Sept. 2000: Urologisches Tertial an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern, München

Berufliche Laufbahn:

Jan. 2001-Feb 2002: Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Großhadern, München:
 Schwerpunkte Gefäßchirurgie und chirurgische Intensivmedizin

 Feb. 2002-Mai 2006: Facharztweiterbildung in der Urologischen Abteilung des Städtischen Klinikums München-Harlaching

- 17.02.2006: Erwerb der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
seit 2002 kontinuierliche Tätigkeit als Notarzt am Standort
Holzkirchen
- 17.05.2006: Facharztprüfung zum Facharzt für Urologie
- seit Mai 2006: Unbefristete Tätigkeit als Facharzt für Urologie an der
Urologischen Abteilung des Städtischen Klinikums München-
Harlaching,
Tätigkeitsschwerpunkte: große Tumorchirurgie, endoskopische
Chirurgie, Ausbilder in der Anwendung von Hochintensivem
fokussiertem Ultraschall (HIFU) zur Behandlung des
Prostatakarzinoms

Vorträge und Präsentationen:

- Mai 2004: Bayerisch-Österreichischer Urologenkongress in Würzburg:
Diagnostische TURP – ein sinnvolles Instrument zur Diagnose
des Prostatakarzinoms?
- Okt. 2004: Dreiländertreffen „Ultraschall 2004“ der DEGUM, Hannover:
- Therapy of prostatic carcinoma with high focussed ultrasound
(HIFU), results and perspectives
- Langzeiteffekte des HIFU in der Behandlung des
Prostatakarzinoms
- Sep. 2006: International Society of Therapeutic Ultrasound ISTU, Oxford:
Treatment results with the new third generation Ablatherm
integrated imaging HIFU machine

Persönliche Interessen:

- Musizieren: Klavier und Akkordeon
- Sport: Fechten und Tauchen